



Implication du système télomères/téломérase au cours de la mastocytose.

Sophie Georgin-Lavialle

► To cite this version:

Sophie Georgin-Lavialle. Implication du système télomères/téломérase au cours de la mastocytose.. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: . tel-00595219

HAL Id: tel-00595219

<https://theses.hal.science/tel-00595219>

Submitted on 1 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année : 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Sophie GEORGIN-LAVIALLE

Le 23 mai 2011

<p>IMPLICATION DU SYSTEME TELOMERES/TELOMERASE</p> <p>AU COURS DE LA MASTOCYTOSE</p>
--

Directeur de Thèse : Pr Olivier HERMINE

Codirecteur : Dr Patrice DUBREUIL

JURY

Membres : Pr William Vainchenker, *Président*

Pr Eric WATTEL, *Rapporteur*

Pr Odile BEYNE-RAUZY, *Rapporteur*

Dr Arturo LONDONO-VALLEJO, *Examineur*

Pr Ludovic MARTIN, *Examineur*

A Patrice, Alexandre et Thibault

MERCI

Je souhaite en premier lieu remercier **Olivier Hermine** : j'avais déjà pu apprécier tes grandes qualités humaines et médicales lorsque j'étais interne dans ton service. Tu m'as ensuite accordé ta confiance en me proposant ce sujet de thèse dans ton laboratoire de recherche. Moi qui ne suis même pas hématologue et qui ne connaissais pas la télomérase... et si peu la mastocytose... j'ai finalement été séduite par ces deux thématiques passionnantes qui ont donné lieu à cette thèse ainsi qu'à d'autres projets clinico-biologiques.

Tu as toujours trouvé le juste équilibre entre me laisser de la liberté dans le choix des moyens et me montrer les objectifs à atteindre. Merci pour ta constante disponibilité, ton soutien total et sans faille dans les moments délicats, tes conseils, tes encouragements et tes précieux conseils pratiques. Je me suis toujours sentie à l'aise au laboratoire et je t'en remercie. Te côtoyer pendant 3 ans m'a permis de m'imprégner de cette ouverture intellectuelle : s'intéresser à tout et toujours essayer de tout comprendre. C'est une véritable stimulation d'assembler les pièces des puzzles pour émettre des hypothèses en croisant les données issues de la littérature, de l'observation des caractéristiques des patients et de la biologie fondamentale. Je souhaite que notre collaboration autour du mastocyte continue d'être fructueuse !

Patrice Dubreuil : merci pour votre disponibilité constante et vos discussions constructives. Merci à votre équipe d'avoir participé aux manipulations.

Merci au **Pr William Vainchenker** de nous faire l'honneur d'avoir accepté de présider mon jury ; ainsi qu'aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail et de venir pour certains de loin en discuter à Necker : **Pr Eric Wattel, Pr Odile Beyne-Rauzy, Pr Ludovic Martin**. Un remerciement tout particulier au **Dr Arturo Londono-Vallejo** avec qui j'ai eu des discussions toujours très enrichissantes autour des télomères depuis 3 ans qui ont débouché sur une collaboration fructueuse.

Julie Bruneau : un grand grand merci pour ton dynamisme, ta gentillesse et tous tes enseignements en histologie. Notre collaboration la dernière année a été très enrichissante et stimulante. Travailler à tes côtés est un réel plaisir et donne envie de faire de l'anapath... incroyable venant d'une interniste... ?

Daniella Silva Moura : merci de t'être impliquée avec moi avec détermination et efficacité sur le projet telomast psy et d'avoir « tenu la barre » pendant ma mésaventure obstétricale...

La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreux scientifiques dans le *laboratoire de Miche DY au CNRS UMR 8147* de l'hôpital Necker. Pour une clinicienne pure, l'immersion totale pendant 3 ans dans cette unité a été extrêmement enrichissante d'un point de vue humain et scientifique. J'ai appris à parler un nouveau langage, j'ai compris et acquis un grand nombre de techniques de biologie; elles ont éclairé ma compréhension de la médecine et m'ont apportée beaucoup à ma pratique quotidienne.

Je remercie en particulier :

Yves Lepelletier : merci pour tes enseignements sur la culture des mastocytes humains et le Calibur ! Notre collaboration a permis de terminer de nombreux travaux qui étaient restés en suspens dans le laboratoire à mon arrivée. J'ai aussi bénéficié de tes nombreux conseils sur l'écriture des articles et leur mise en forme.

Anne-Sophie Gabet : merci pour ta supervision de mes téloblots et ton soutien même lors des échecs de blots ou de transfections... Merci de ta relecture attentive de mes écrits sur les télomères !

Séverine Coulon : un très très grand merci pour tous tes conseils, ta gentillesse et ta disponibilité.

Anne-Laure Gacon : merci pour tes programmes d'analyse et ton aide en informatique (excel, prism et photoshop n'ont plus de secrets pour moi !).

Ivan Cruz Moura : merci pour ces discussions des samedis après midi avec tes conseils sur la transfection et l'extraction d'ADN.

Anne Brignier : merci de m'avoir guidée dans mes débuts au labo 584, 10 ans après notre rencontre en certificat d'immunologie en DCEM₁ !!

Geneviève Courtois : merci pour ton aide notamment pour les fameux sandwiches de transfert de Southern blot.

Frédéric Feger : merci pour tes conseils précieux et avisés sur la culture et le phénotypage des mastocytes.

Aurélien Fricot : merci d'avoir pris mon relais sur les ficoll de patients et d'avoir géré la database mastocytose lors de mon congé maternité.

Pierre Milpied : merci pour ton humour du midi et ton aide pour les calculs mathématiques compliqués !

Amédée Renand: merci « ficollman » pour tes nombreux conseils de culture, et pour avoir accepté de former une « satanée médecin » au Campto... Je vais regretter nos discussions « foot » du midi.

Céline Callens: merci pour m'avoir initiée aux joies de la RTQPCR!

Jean-Antoine Ribeil: merci de m'avoir fait connaître l'Institut Curie, j'y ai appris beaucoup auprès des enfants et adultes atteints de pathologies cancéreuses pour ma pratique de médecin.

Merci à tous les membres de *l'unité CNRS UMR 8147* et plus particulièrement les secrétaires Catherine et Fabienne, Francine (à quand l'aboutissement de notre projet sérotonine-masto?), François, Séverine, Rachel, Mélanie, Pascaline, Emilie...

Merci à la confrérie des internistes de Necker : *Dr Jean-Benoît Arlet*: spéciale dédicace au projet TEPIM1 ; et *Dr Achille Aouba*: clin d'œil à nos revues, case reports et au fructueux travail sur l'Anakinra.

Merci aux *membres du CEREMAST*: Anne-Florence Bellais, Catherine Grandpeix, Olivia Chandesris, Isabelle Hirsch : merci pour votre bonne humeur et votre aide pour recruter des patients dans les études fondamentales!

Merci à *l'équipe du laboratoire d'hématologie biologique*: Vahid Asnafi, Chantal Brouzes, Patrick Villarese : merci de m'avoir enseigné la cytologie du mastocyte et la RT Q_PCR. Plus spécifiquement, merci à *Ludovic Lhermitte* pour cette belle association autour du projet « Phénomast ».

Merci à *l'équipe du laboratoire d'anatomopathologie de Necker*: Danielle Canioni, Sylvie Fraitag et Nicole Brousse, ainsi que les techniciennes qui m'ont appris à couper les blocs et m'ont accompagnée sur les marquages d'immunohistochimie.

Merci à tous les médecins qui ont inclus des patients à travers la France et en particulier *Stéphane Barete, Christine Bodemer, Gandhi Damaj, Olivier Lortholary, Felipe Suarez*.

Merci à *Houcine Bougherara*: pour notre collaboration fructueuse sur les techniques et prélèvements et pour faire émerger le projet Phénodasatinib. Merci pour ton soutien moral lors de la dernière année !

Une pensée pour *mes collègues et amis issus du DEA d'Immuno de Pasteur*: Anne Brignier, Guillaume Bussonne, Sophie Cereja, Mathieu Jablonski. Merci à ceux qui m'ont formée à manipuler en DEA, notamment Claire Fieschi et Nicolas Vince.

Merci à la *FRM* qui a financé ma 1^{ère} année de thèse, puis au *CNRS et à l'AP-HP* pour m'avoir fait bénéficier d'un poste accueil pendant la 2^{ème} et 3^{ème} année ; enfin à la *Société Nationale Française de Médecine Interne* pour ma bourse sur le travail « telomastpsy ».

Merci aux différents services où j'ai passé beaucoup de nuits et de week-ends pendant ces 4 années de labo entre le DEA et la thèse : *la réanimation polyvalente de la clinique Geoffroy St Hilaire, l'Institut Curie et le service d'hématologie adulte de Necker*. J'y ai gagné en maturité dans la prise en charge des patients atteints de pathologies oncologiques.

Enfin merci au *Pr Pouchot*, que j'ai rencontré en 1^{er} semestre d'internat et qui m'a fait confiance pour intégrer l'équipe de médecine interne polyvalente après 4 ans de recherche. Merci au *Pr Capron* de m'avoir accueillie dans son service comme chef de clinique le 1^{er} novembre dernier et où nous avons posé les bases d'un futur projet de recherche sur l'interaction des mastocytes et du système cardiovasculaire à l'HEGP.

Mes remerciements s'adressent bien sûr également à ma famille :

- *mes parents et beaux parents* pour avoir bien souvent gardé les enfants afin que je puisse manipuler l'esprit serein !
- *Alexandre et Thibault* pour leur amour et leur patience envers leur maman

Enfin,

Patrice,

Merci pour ton soutien indéfectible, pour ta confiance en moi depuis toutes ces années.

Tu chemines à mes côtés alors que je suis souvent accaparée par ma passion de médecin et apprentie chercheur qui est prenante et exigeante.

Tu as accepté sans sourciller que j'ajoute à mes 12 ans de médecine, un petit bonus de 4 ans de recherche pour le plaisir... ce qui voulais dire me former à un nouveau métier, pas seulement pour 6 mois comme lorsque je changeais de spécialité lors de l'internat, mais réapprendre une nouvelle façon de penser, de travailler.

Merci pour ta patience envers mon hyperactivité permanente...

Merci d'avoir été mon coach sportif pour que la course me donne l'énergie d'assumer toutes mes fonctions !

Ce travail te doit beaucoup... qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension, de privations et d'efforts communs.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	9
ABREVIATIONS.....	11
AVANT PROPOS	13
INTRODUCTION	15
1. Introduction générale.....	15
2. Le Mastocyte.....	16
Cytologie	16
Ontogenèse	16
SCF et son récepteur c-Kit (CD117)	17
Rôles du mastocyte	17
3. La mastocytose.....	19
Epidémiologie.....	19
Physiopathologie des mastocytoses	20
Manifestations cliniques	24
Traitement.....	25
4. <i>Le système télomères/télomérase.</i>	27
Structure et fonctions des télomères.....	27
Techniques de mesure de la longueur des télomères.....	27
La télomérase : structure et fonctions.....	29
<i>hTR, la sous-unité ribonucléique</i>	29
Techniques de mesure de l'activité télomérasique.....	30
Rôles de la télomérase.....	33
Télomérase et cancer	37
Télomères et stress	40
Pathologies tumorales spontanément régressives chez les enfants	40
Les tumeurs pédiatriques cérébrales	40

Les leucémies transitoires	41
Tumeurs cérébrales pédiatriques.....	41
Les papuloses lymphomatoïdes	42
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	43
Problématique.....	43
Hypothèses	44
RESULTATS	46
1. Travail sur la différence d'évolution de la maladie entre les enfants et les adultes.	46
2. Travail sur les troubles psychiques et le métabolisme des télomères au cours de la mastocytose.	
77	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	100
Travail sur la régression des formes pédiatriques et l'expression de la télomérase.	100
Travail sur le système télomères/télomérase et les troubles psychiatriques rencontrés au cours de la mastocytose de l'adulte.	106
Perspectives générales.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	112
ANNEXES	119
Liste des publications et communications relatives à la mastocytose et /ou au système télomères/télomérase.	120
Publications	120
Communications orales	121
Communications affichées :	121
Articles scientifiques.....	122
Revues	182

ABBREVIATIONS

AND: Acide desoxyribonucléique

ALT: Alternative Lengthening of Telomeres

ARN: Acide ribonucléique

ASM: Aggressive systemic mastocytosis

CM: Cutaneous mastocytosis

ECD: extracellular domain (*c-Kit* mutation)

ELISA: Enzymatic Linked Immuno Sorbent Assay

FBS: foetal bovine serum

Flow-FISH: Flow Cytometry Fluorescence In Situ Hybridation

hTER ou hTR ou hTERC: human Telomerase RNA

hTERT: human Telomerase Reverse Transcriptase

IL: Interleukine

ISM: Indolent Systemic mastocytosis

JAK2: Janus kinase 2

MC: Mast cell

MCL: Mast cell leukaemia

MCS: Mast cell sarcoma

PB: Peripheral blood

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate-buffered saline

PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PTD: phosphotransferase domain (*c-Kit* mutation)

Q-FISH: Quantitative Fluorescence In Situ Hybridation

RTL: Relative Telomere Length

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SCF: Stem cell factor

SM: Systemic mastocytosis

SM-AHNMD: SM with an associated clonal haematological non-MC-lineage disease

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TRAP: Telomere Repeat Amplification Protocol

WT : Wild Type (forme sauvage)

AVANT PROPOS

Les mastocytoses sont caractérisées par une prolifération anormale de mastocytes dans différents tissus de l'organisme. Chez l'adulte, les mastocytoses sont associées à des mutations activatrices du récepteur c-Kit, le plus souvent dans l'exon 17. Les formes pédiatriques régressent à l'adolescence, contrairement aux formes adultes. Il a récemment été montré que les mastocytoses pédiatriques sont en fait des maladies clonales associées à des mutations de *c-Kit* différentes de celles des adultes, touchant le domaine extra cellulaire (ECD) de c-Kit pour les formes pédiatriques versus le domaine phosphotransferase (PTD) pour les formes adultes.

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques spécialisées qui protègent l'extrémité des chromosomes et dont la taille se réduit à chaque division cellulaire. Les télomères, en se raccourcissant à chaque division, sont aussi impliqués dans les processus de vieillissement cellulaire. Ainsi, lorsqu'ils atteignent une taille critique, la cellule entre en sénescence et arrêt de proliférer, à moins qu'elle ne mette en oeuvre une stratégie afin d'éviter l'attrition télomérique, soit le mécanisme d'ALT (Alternative Lengthening of Telomere) par recombinaison, soit par l'expression d'une enzyme, la télomérase. En cancérologie, la réactivation de la télomérase entraîne l'immortalisation des cellules. Ainsi, le système télomères/télomérase a fait l'objet de recherches intensives depuis une quinzaine d'années afin de déterminer des cibles thérapeutiques nouvelles.

Il existe des anomalies du système télomères/télomérase dans des tumeurs primitives cérébrales pédiatriques qui ont la particularité de régresser à l'adolescence. Par analogie avec ces données, nous avons émis l'hypothèse que le système télomères/télomérase pouvait être

impliqué dans la physiopathologie des mastocytoses, notamment pour expliquer la régression des formes pédiatriques.

Par ailleurs, les adultes avec mastocytose présentent dans plus de 60% des cas des troubles psychologiques à type de syndrome dépressif, irritabilité, anxiété. Les travaux d'Elisabeth Blackburn, prix Nobel 2009 sur les télomères, ont montré que la longueur des télomères dans les cellules mononuclées du sang de patients soumis à un stress psychologique était raccourcie par rapport à des contrôles sains appariés en âge. Nous avons souhaité étudier les télomères et l'activité de la télomérase des PBMC d'une cohorte d'adultes atteints de mastocytose afin de savoir si la longueur de leurs télomères, comparés à des contrôles sains appariés en âge, variait ou non en fonction des troubles psychiques qu'ils présentent et si ce phénomène pouvait être relié à l'infiltration de leur organisme par des mastocytes anormaux.

Après un rappel sur la mastocytose et le système télomères/télomérase, deux aspects de la biologie des télomères au cours de la mastocytose vont successivement être présentés au cours de ce travail :

- Implication différentielle de ce système entre les enfants et les adultes d'une part.
- Relation avec les manifestations psychiques des adultes d'autre part.

Puis certains aspects étudiés en parallèle au laboratoire et concernant la physiopathologie de la mastocytose et l'utilisation de la cytométrie en flux dans cette maladie sont présentés dans les annexes.

INTRODUCTION

1. Introduction générale

Les mastocytoses sont des maladies rares et hétérogènes. On distingue classiquement les formes cutanées pures (90 %) et les formes systémiques (10 %). En 2011, en France 2100 cas de cas de mastocytose ont été recensés par l'*Association française pour les initiatives de recherche sur le mastocyte et les mastocytoses* (Afirmm). Les manifestations cliniques sont variables ¹⁻³, soit en rapport avec la libération de médiateurs mastocytaires, soit la conséquence d'une infiltration tumorale. L'aspect clinique protéiforme et la variabilité de l'évolution ont conduit à de nouvelles classifications et à de nouvelles recommandations thérapeutiques. De récentes études moléculaires ont démontré que les mastocytoses pouvaient être en fait assimilées à des syndrômes myéloprolifératifs. La mise en évidence d'une mutation de *c-Kit* chez la plupart des patients présentant une forme sporadique de mastocytose suggère un rôle essentiel de cette tyrosine kinase dans l'origine de la maladie et permet d'espérer de nouvelles voies thérapeutiques ciblées. Au total, la mastocytose est une maladie clonale, régressant souvent à l'adolescence chez les enfants, volontiers systémique chez l'adulte et associée à des troubles psychologiques.

2. *Le Mastocyte*

Cytologie

Le mastocyte fut décrit pour la première fois en 1879 par Ehrlich décrivit le mastocyte. Il s'agit d'une cellule mononucléée de 8 à 20 μm de diamètre, de forme variable (ronde, ovale, polygonale ou fusiforme) avec un gros noyau rond central et un nucléole mal individualisé. Son cytoplasme basophile est rempli de très nombreuses granulations métachromiques denses de 0,3 à 1,5 μm , colorées en violet par le Giemsa et en rouge orangé par le bleu alcian à pH acide, dont la mise en évidence peut faciliter l'identification des mastocytes. Elles sont absentes en cas de dégranulation spontanée ou provoquée par une agression mécanique comme par exemple une biopsie ^{3, 4}. Ces granulations intracytoplasmiques contiennent de nombreux médiateurs comme l'histamine, l'héparine, la tryptase, des cytokines et chimiokines. Les mastocytes sont présents en quantité variable dans tous les tissus conjonctifs-derme, foie, tube digestif, péritoine, moelle osseuse, ganglions, rate- en périphérie des vaisseaux et des nerfs ⁵.

Ontogenèse

Les mastocytes dérivent de cellules souches pluripotentes hématopoïétiques qui dans la moelle osseuse se différencient en précurseurs CD34^+ , c-kit^+ , CD13^+ (10). Ces précurseurs médullaires, vont passer dans le sang et sous l'influence de diverses chimiokines et cytokines (IL-6, IL-10, SCF), vont coloniser différents tissus pour y terminer leur différenciation en mastocytes matures ⁶⁻¹⁰. La maturation des mastocytes est fonction de l'environnement cytokinique dans les tissus. Ainsi, la maturation des précurseurs mastocytaires donne naissance à des mastocytes exprimant essentiellement la tryptase (MCT, ou mastocytes “ muqueux ”) présents dans la muqueuse du tube digestif et des bronches, ou à des mastocytes

exprimant la tryptase et la chymase (MCTC, ou mastocytes “ séreux ”) observés dans la peau, les ganglions, les parois vasculaires et la sous-muqueuse digestive ¹¹. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la présence d'un précurseur mastocytaire circulant CD34⁻c-Kit⁺ dans le sang de patients atteints de mastocytose qui est capable de se différencier en mastocyte mature après culture *in vitro* et dont le taux varie avec l'activité et l'agressivité de la maladie (Georgin-Lavialle *et al*, manuscrit soumis- cf annexe).

SCF et son récepteur c-Kit (CD117)

Le *stem cell factor* (SCF) est la principale cytokine impliquée dans la mastocytopoïèse ¹²⁻¹⁵. C-Kit (CD117) est son récepteur. L'invalidation de ces deux gènes chez la souris conduit à une absence de mastocytes. C-kit est un récepteur transmembranaire de type III, appartenant à la famille des tyrosine-kinases, dérivé du proto-oncogène *c-Kit* localisé sur le chromosome 4q12. Ce récepteur est exprimé non seulement par les mastocytes ¹³ mais aussi par les progéniteurs hématopoïétiques, les mélanocytes, les cellules germinales et les cellules interstitielles de Cajal ¹⁶. Les mastocytes sont les seules cellules hématopoïétiques qui expriment c-Kit tout au long de leur différenciation ¹⁷. C-Kit comporte un domaine kinase 1 juxta-membranaire, site de liaison de l'ATP, et un domaine kinase 2, site de l'activité phosphotransférase. La liaison du SCF à c-Kit provoque sa dimérisation et sa phosphorylation. Il s'ensuit une activation des voies Ras-Map kinase, Src kinase, STAT et PI3 kinase/AKT, permettant la migration, prolifération, la survie et l'activation des mastocytes ¹⁸.

Rôles du mastocyte

En libérant certains médiateurs, le mastocyte participe à divers processus biologiques : hypersensibilité de type immédiat, inflammation, défense vis-à-vis de certains parasites, notamment intestinaux, réponse à une prolifération tumorale, processus de cicatrisation et de

fibrose, ainsi qu'à l'angiogénèse ¹⁹. Certains médiateurs préformés sont libérés lors de la dégranulation ²⁰, comme l'histamine ou la tryptase. D'autres médiateurs, dits néosynthétisés, ne sont formés qu'après activation du mastocyte comme les leucotriènes B4 et C4, le facteur d'activation des ainsi que certaines cytokines et chimiokines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF et TNF alpha). La dégranulation des mastocytes peut résulter de deux mécanismes distincts ²¹. Le mécanisme immunologique, médié par les IgE, mais parfois également par certaines fractions du complément (C3a, C4a, C5a), certaines lymphokines et divers stimuli non immunologiques peuvent également la provoquer : aliments, médicaments, stimulations physiques ou émotionnelles ²².

3. La mastocytose

Epidémiologie

La mastocytose se caractérise par l'accumulation de mastocytes dans différents organes. Les organes les plus fréquemment atteints au cours des mastocytoses systémiques sont la peau (60-95 %), l'os (90 %), le foie (60 %), la rate (50 %) et le tube digestif. C'est une maladie orpheline, dont la prévalence dans le monde est estimée entre 200 000 et 300 000 patients ²³. Elle touche préférentiellement les sujets caucasiens, sans prépondérance de sexe. C'est une maladie sporadique, néanmoins de rares cas familiaux ont été rapportés ²⁴. En 2011, un registre épidémiologique initié par l'Afirmm, a permis de recenser en France déjà 2100 patients atteints dont au moins 10% d'enfants.

On distingue classiquement deux types de mastocytoses : cutanée pure et systémique. La mastocytose cutanée pure est une maladie essentiellement pédiatrique, au cours de laquelle les mastocytes envahissent uniquement la peau, qui disparaît le plus souvent lors de la puberté. Les mastocytoses systémiques sont au contraire une maladie chronique essentiellement de l'adulte (âge moyen au diagnostic : 60 ans) où les mastocytes s'accumulent également dans d'autres organes (moelle, foie, rate, tube digestif, os...). Avec les nouvelles techniques plus sensibles de détection des mastocytes médullaires les formes systémiques représentent sans doute 95% des cas (Georgin-Lavialle, Lhermitte L et al, manuscrit en préparation). Plus rarement, entre 10% et 15% des cas, cette infiltration s'accompagne d'un défaut de fonctionnement de l'organe atteint, la maladie est alors classée comme agressive. Elle peut être associée à une hémopathie clonale, le plus souvent myéloïde (myélodysplasie, syndrome myéloprolifératif) et est alors classée comme mastocytose associée à une hémopathie clonale non mastocytaire. Son pronostic vital est lié au degré d'infiltration tissulaire et à la fibrose qui en résulte, aux hémopathies associées et à certaines manifestations paroxystiques (choc

anaphylactique) liées à la libération du contenu des granules mastocytaires. Cependant, il faut souligner d'emblée que bien que dans la plupart des cas la maladie ne diminue pas l'espérance de vie des malades ^{25, 26}, elle reste associée à un handicap important, parfois mal connu ²⁷, lié à la libération des médiateurs mastocytaires et qui pose parfois des problèmes diagnostics, quand l'infiltration mastocytaire n'est pas au premier plan, et thérapeutiques.

Physiopathologie des mastocytoses

Des mutations de *c-Kit* sont vraisemblablement à l'origine de cette pathologie. En effet, l'activation de c-kit a été constatée en l'absence du ligand SCF dans des lignées de cellules mastocytaires ^{28, 29}, et dans des cas de mutations activatrices de *c-kit* observées au cours des hémopathies myéloïdes ³⁰. Ainsi, la présence de mutations activatrices de *c-Kit* entraîne une autophosphorylation à l'origine de la différenciation, migration et de l'accumulation de mastocytes dans les différents tissus ³¹⁻³⁵. Il est probable que dans certains cas ces mutations induisent une expansion anormale des précurseurs mastocytaires sanguins, dont le nombre semble être corrélé à l'agressivité de la maladie.

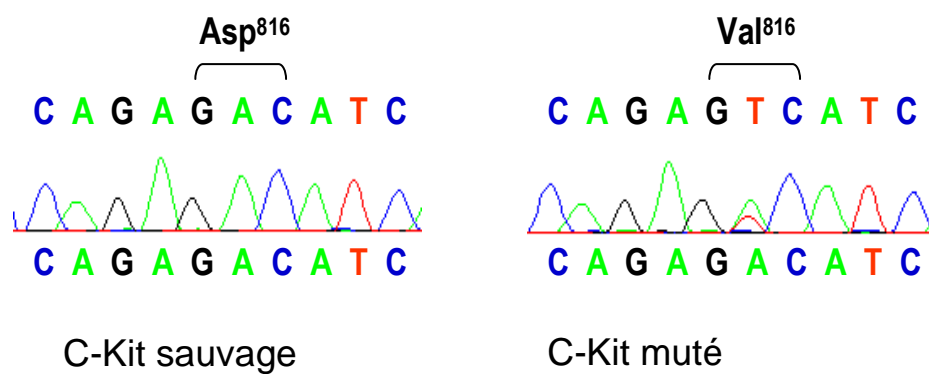
La mutation D816V est détectée chez environ 70 % des adultes atteints de mastocytose systémique. Elle est située dans l'exon 17 de *c-Kit* et touche le domaine phosphotransférase (PTD) à activité tyrosine kinase du récepteur c-Kit. C'est la mutation la plus fréquente. Ainsi une étude espagnole a retrouvé dans la moelle osseuse une prévalence de cette mutation de 93 % parmi les patients atteints de mastocytose indolente ou agressive ³⁶. Certains auteurs la considèrent comme un facteur de mauvais pronostic ; en effet elle se situe dans la zone catalytique de la tyrosine kinase, ce qui la rend naturellement résistante à l'imatinib mésylate ³⁷. Une étude récente menée par l'AFIRMM en France concernant l'étude de la fréquence de cette mutation dans la peau et la moelle retrouve la mutation D816V dans 85% des cas des

formes systémiques et 70% des formes cutanées pures. Cette fréquence n'est pas augmentée dans les formes agressives. Il existe d'autres mutations codant pour le domaine catalytique de c-Kit, mais elles sont très rares et aboutissent également à une activation constitutive du récepteur. Rarement des mutations dans le domaine juxta-membranaire de c-kit sont aussi décrites³⁸⁻⁴⁰. Toutes ces mutations sont également capables d'activer le récepteur de façon constitutive et à la différence des mutations du site catalytique l'autophosphorylation du récepteur est inhibée par l'imatinib mésylate démontrant le rôle crucial de ces mutations et de l'activation constitutive de c-kit dans les mastocytoses.

Dans les formes pédiatriques la plupart des études ne retrouvent la mutation D816V que de façon minoritaire. Sa présence serait associée aux formes systémiques. Ainsi il était couramment admis que chez l'enfant à la différence des formes de l'adulte, la maladie n'était pas clonale et non liée à des mutations de *c-kit*, mais que l'accumulation mastocytaire était plus réactionnelle pouvant expliquer sa régression dans un grand nombre de cas. En fait une étude récente menée en France en étudiant la séquence de tous les exons de *c-kit*, sur plus de 50 patients pédiatriques a montré que plus de 85% des enfants avec une mastocytose pédiatrique présentent des mutations de *c-kit*⁴¹. La présence de ces mutations ne semble pas être corrélée au tableau clinique. Un suivi prospectif permettra de déterminer si certaines d'entre elles sont associées à la régression de la maladie. De façon intéressante chez les enfants, les mutations de *c-Kit* sont localisées préférentiellement dans les exons 8,9, codant pour le domaine extracellulaire (ECD) de c-Kit. Elles induisent comme la mutation D816V une autophosphorylation du récepteur, mais semble induire des cascades de phosphorylations en intracellulaires différentes de celles de la mutation D816V. Elles sont sans doute oncogéniques, étant retrouvées dans d'autres tumeurs comme les leucémies aiguës.

Les voies de signalisation intracellulaires diffèrent entre les mutants ECD versus PTD de *c-Kit*. Toutes les mutations signalent par la voie STAT/SRC, mais les formes ECD signalent surtout par la voie AKT. De plus, il existe une forte activité transformante des mutants ECD alors que les PTD présentent surtout une différenciation mastocytaire ⁴².

Séquence de *c-kit* normale et avec la mutation D816V.



Classification des Mastocytoses (OMS 2001) et nouvelles formes, adapté de Akin *et al*³¹.

Catégorie	Critères diagnostiques	Pronostic
Mastocytose cutanée	Absence d'atteinte systémique Age de survenue < 2 ans	Bon
Mastocytose systémique indolente	Pas d'argument en faveur d'une mastocytose systémique grave Age de survenue > 2 ans Sous-type le + fréquent chez l'adulte	Bon
Mastocytose « smoldering »	Infiltration Médullaire, Tryptase >200ng/ml Pas de signe d'insuffisance d'organe (signes C) Dysmyélopoïèse, organomégalie (signes B)	
Syndrome d'activation Mastocytaire monoclonal ou non	Signes cliniques évocateurs de dégranulation Pas d'amas mastocytaire, cellules CD25+/c-kit+ Mutations <i>c-kit</i> présente ou non	
Mastocytose systémique associée à une hémopathie maligne non mastocytaire	Classiquement associée à une MDS ou un SMP + rarement associée à une LA ou un LNH	Celui de l'hémopathie associée
Mastocytose systémique agressive	Existence de signe témoignant d'une défaillance d'organe secondaire à l'infiltration mastocytaire (signes C) : -insuffisance médullaire -insuffisance hépatique avec ascite -splénomégalie avec hypersplénisme -ostéolyses et fractures pathologiques -atteinte du tractus digestif avec malabsorption et amaigrissement	Mauvais
Leucémie à mastocytes	Mastocytes atypiques (multilobulés, multinucléés) et > 10% de mastocytes circulants ou > 20% de mastocytes sur le myélogramme	Mauvais
Leucémies à mastocytes aleucémiques	Idem mais <10% mastocytes circulants	Mauvais
Sarcome mastocytaire	Tumeur maligne détruisant les tissus mous Atypie cellulaire mastocytaire ++	Mauvais
Mastocytome extra-cutané	Tumeur bénigne rare Cellules matures normales	Bon

MDS : myélodysplasie. SMP : syndrome myéloprolifératif. LA : leucémie aigue. LNH : lymphome non hodgkinien.

Manifestations cliniques

Les signes cliniques des mastocytoses sont la conséquence de la dégranulation mastocytaire et/ou de l'infiltration tumorale. Des signes généraux sont fréquemment observés, comme la fatigue parfois très handicapante et des douleurs diffuses ostéomusculaires même sans lésion anatomique. Outre les manifestations classiques, ont été rapportés plus récemment de rares accidents vasculaires cérébraux ⁴³, des atteintes cutanées diffuses ⁴⁴, de très rares insuffisances cardiaques par infiltration des trois tuniques du cœur ^{1, 45}. Les adultes avec mastocytose présentent dans plus de 60% des cas des troubles psychologiques à type de syndrome dépressif, irritabilité, anxiété ³ ainsi que des troubles marqués de l'attention et de la concentration (D. Moura-Silva, manuscrit en préparation). Parfois certains patients présentent des comportements agressifs paroxystiques. Une baisse de la libido est notée chez la moitié des patients.

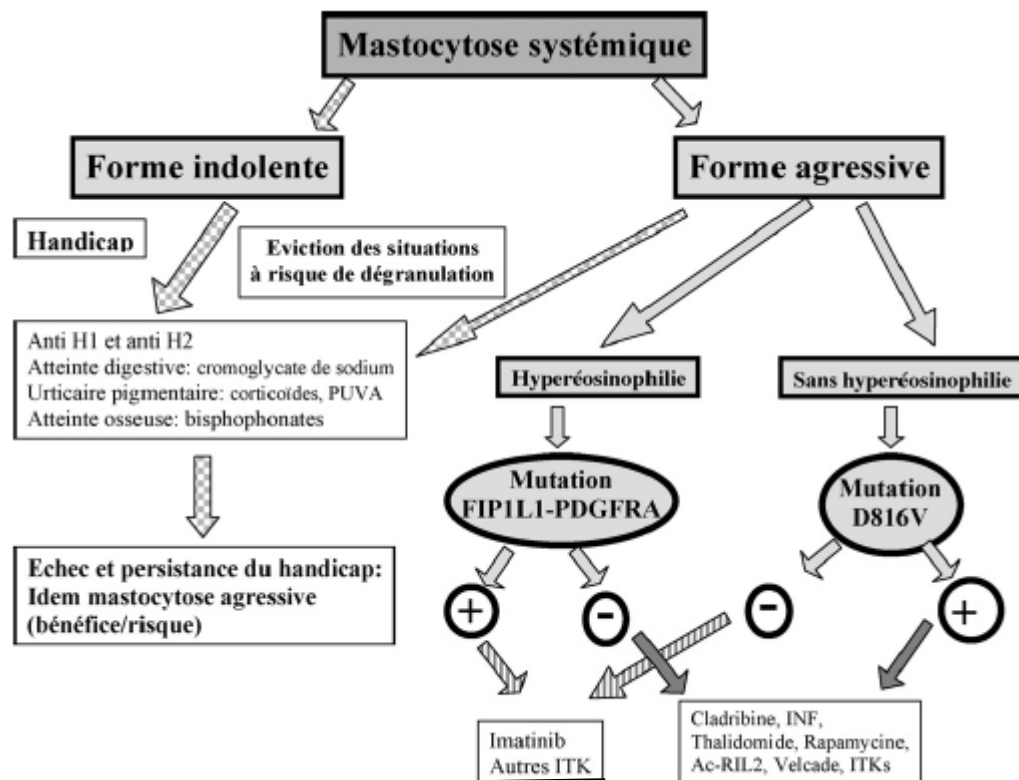
Toutes ces manifestations cliniques sont hétérogènes et ressenties de façon très diverses d'un patient à un autre pour le même type d'atteinte. Ce ressenti est responsable d'un handicap parfois marqué ayant des conséquences socio-professionnelles parfois dramatiques. Ainsi dans une étude récente de l'AFIRMM ²⁷ portant sur plus de 300 patients 70% d'entre eux s'estiment handicapés par leur maladie dont 25% sévèrement. Ce handicap n'est pas corrélé à la masse mastocytaire, à l'agressivité de la maladie, au taux de tryptase sérique ni aux types de mutations de *c-Kit*. Ainsi des patients présentant une urticaire pigmentaire isolée s'estiment parfois davantage handicapés que des patients avec des formes agressives de la maladie.

Principales manifestations cliniques observées au cours des mastocytoses, d'après Travis *et al*³

<i>Organe atteint</i>	<i>Symptômes observés</i>	<i>Fréquence de survenue (%)</i>
Os	Douleurs	19
	Arthralgies	9
	Images Radiologiques	58
Hépatique	Hépatomégalie	41
	Perturbations du Bilan Hépatique	29
	Ascite, hypertension portale	
Tube Digestif	Douleurs abdominales	35
	Nausées et vomissements	21
	Diarhées	24
SNC	Anxiété, dépression , démence...	19
Pulmonaire	Fibrose interstitielle	16
Urinaire	Pollakiurie, cystite interstitielle	-

Traitement

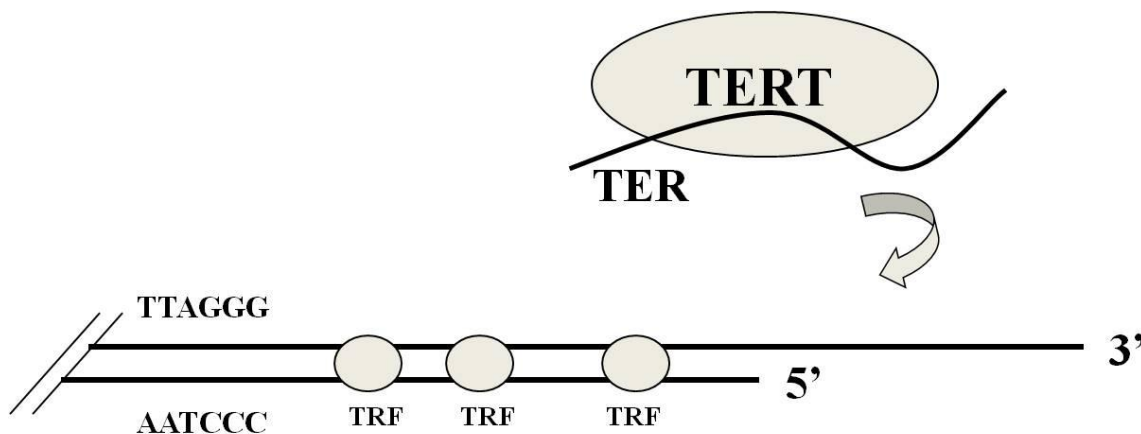
La mastocytose nécessite une adaptation thérapeutique à chaque profil de patient. Compte tenu de sa faible prévalence, le traitement est essentiellement fondé sur l'expérience et comporte deux grands axes^{2, 46}. Le premier vise à prévenir et à limiter la dégranulation et/ou ses conséquences ; c'était, jusqu'à très récemment, le seul traitement que l'on pouvait proposer. Le second a pour objectif de contrôler la prolifération tumorale mastocytaire. Les récents progrès accomplis dans la compréhension de la physiopathologie ont permis de nouvelles approches thérapeutiques, ainsi des inhibiteurs de tyrosine kinases sont en cours de développement afin d'inhiber l'activité tyrosine kinase de c-Kit et ainsi bloquer l'activation, la migration et la survie des mastocytes pathologiques⁴⁶.



4. Le système télomères/téломérase.

Structure et fonctions des télomères

Les télomères sont des structures spécialisées constitués de plusieurs centaines de répétitions nucléotidiques de séquences 5'-TTAGGG-3' associées à des protéines. La taille moyenne des télomères varie chez l'homme de 10 à 15 kilobases ⁴⁷⁻⁴⁹. Les télomères ont au moins deux fonctions : protéger les extrémités chromosomiques d'une dégradation de l'ADN par les exonucléases et prévenir les fusions de deux extrémités de chromosome capables d'entraîner des cassures et des recombinaisons chromosomiques ⁵⁰.



Techniques de mesure de la longueur des télomères

La technique de référence est le Southern blot et permet la mesure de la taille moyenne des télomères d'une population cellulaire donnée ⁵¹. Après digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction permettant de préserver les répétitions télomériques, les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose puis transférés sur membrane de nylon. Cette

membrane est alors incubée en présence d'une sonde nucléotidique marquée puis révélée par autoradiographie ou chemiluminescence. Les fragments télomériques apparaissent sous la forme d'un poids moléculaire ADN et leur longueur moyenne est calculée en comparant au marqueur de taille de l'ADN déposé sur le gel. Cette technique permet d'obtenir la longueur moyenne des télomères d'une population cellulaire.

La technique du Q-FISH ou Quantitative-Fluorescence (*in situ* hybridation) utilise des sondes d'acides nucléiques peptidiques, PNA Peptide Nucleic Acid, de séquences (CCCTAA)₃ marquées par un fluorochrome. Les sondes vont reconnaître les extrémités télomériques et s'hybrider. La lecture grâce à un microscope à fluorescence des cellules en métaphase va permettre de mesurer l'intensité de fluorescence au niveau de chaque télomère, puis en comparant avec la fluorescence de plasmides calibrateurs, de calculer précisément la longueur des télomères ⁵². Cette technique présente donc l'avantage de permettre de mesurer la longueur des télomères au niveau de chaque chromosome et non une moyenne de la population.

Plus récemment, la méthode du Flow-FISH, plus précise, utilisant la cytométrie en flux, a été développée ⁵³. Elle utilise des sondes synthétiques PNA (*peptide nucleic acids*) qui sont des analogues des acides nucléiques. Ces sondes sont très stables et résistantes aux protéases et nucléases. Des sondes PNA spécifiques des séquences télomériques sont hybridées sur les cellules en suspension. La mesure de la moyenne de fluorescence (en cytométrie en flux) dans l'échantillon cellulaire donne la longueur des télomères dans cet échantillon. La quantification est réalisée en comparant la fluorescence de l'échantillon à celle d'une lignée cellulaire ayant une longueur télomérique constante et utilisée comme étalon interne. Les résultats sont alors obtenus en longueur relative.

Certains de ces obstacles ont été surmontés avec la mise au point de la technique de PCR en temps réel (RT-PCR) pour mesurer la longueur des télomères. La RT-PCR consiste à déterminer les télomères à copie unique du gène (T / S) ratio. Ce ratio est proportionnel à la longueur moyenne des télomères dans une cellule. L'analyse en RT-PCR peut être utilisée en haut débit sur plaques 96 puits, ce qui rend cette technique faisable sur de larges cohortes de patients.

La télomérase : structure et fonctions

La longueur des télomères diminue à chaque division cellulaire du fait de l'incapacité de la DNA polymérase à répliquer complètement les extrémités terminales d'une molécule d'ADN linéaire. La télomérase est une enzyme de type reverse transcriptase capable d'ajouter des séquences TTAGGG aux extrémités 3' des chromosomes, compensant ainsi la perte de longueur télomérique ⁵⁴. La télomérase est composée de deux éléments nécessaires à son activité : une sous-unité catalytique protéique portant l'activité transcriptase inverse (hTERT, *human telomerase reverse transcriptase*) et un ARN matriciel (hTR, *human telomerase RNA*, encore appelé TERC, *telomerase RNA component*) qui présente un motif complémentaire aux répétitions télomériques. Ce dernier est susceptible d'être partiellement rétro-transcrit par hTERT, conduisant ainsi à l'addition d'une ou plusieurs copies du motif GGTTAG à l'extrémité 3' de l'ADN (figure 1) ⁵⁵.

hTR, la sous-unité ribonucléique

A la suite de leurs travaux de découverte de la télomérase chez le cilié *Tetrahymena*, l'équipe de Blackburn a montré que cette enzyme est dépendante d'un ARN pour son activité ^{49, 56}. Cet ARN, replié dans une structure tridimensionnelle complexe, sert de matrice pour l'addition des séquences télomériques par la sous-unité catalytique de la télomérase.

hTERT, la sous-unité catalytique

Le gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, TERT, a été tout d'abord cloné chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), et un protozoaire cilié (*Euplotes aediculatus*)^{57, 58}. La comparaison des séquences de ces protéines avec les banques de données a permis de mettre en évidence la présence de 7 domaines conservés caractéristiques des transcriptases inverses⁵⁹. De plus, il apparaît que les TERTs font parties d'une grande famille de protéines caractérisées par une structure en « doigts-paume-pouce »⁶⁰. Cependant il existe plusieurs différences de structure entre les protéines de la famille TERT et les transcriptases inverses classiques ce qui explique que, contrairement aux transcriptases inverses conventionnelles, les TERTs ne sont pas capables de transcrire de longues séquences d'ARN, elles ne copient que quelques nucléotides puis répètent l'opération après translocation de la matrice d'ARN afin d'obtenir des séquences télomériques répétées. Plusieurs conditions sont nécessaires à cette activité enzymatique : l'intégrité du site catalytique, la liaison à la matrice d'ARN, et la dimérisation ou l'oligomérisation de la protéine.

Techniques de mesure de l'activité télomérasique

La détection de l'activité de la télomérase dans des échantillons biologiques peut être réalisée grâce à la méthode du TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol). Cette technique est composée de deux phases, la première permet l'élongation *in vitro* d'un fragment télomérique synthétique par la télomérase contenue dans l'extrait cellulaire, la deuxième permet la détection de ces produits d'élongation par amplification par PCR⁶¹.

Le principe initial de la technique TRAP consiste en l'utilisation d'une amorce synthétique (TS) mimant une extrémité télomérique et d'une seconde amorce (CX) permettant l'amplification par PCR des produits d'élongation. La télomérase contenue dans l'extrait cellulaire va ainsi, en présence de dNTP, ajouter des répétitions télomériques à l'extrémité 3'

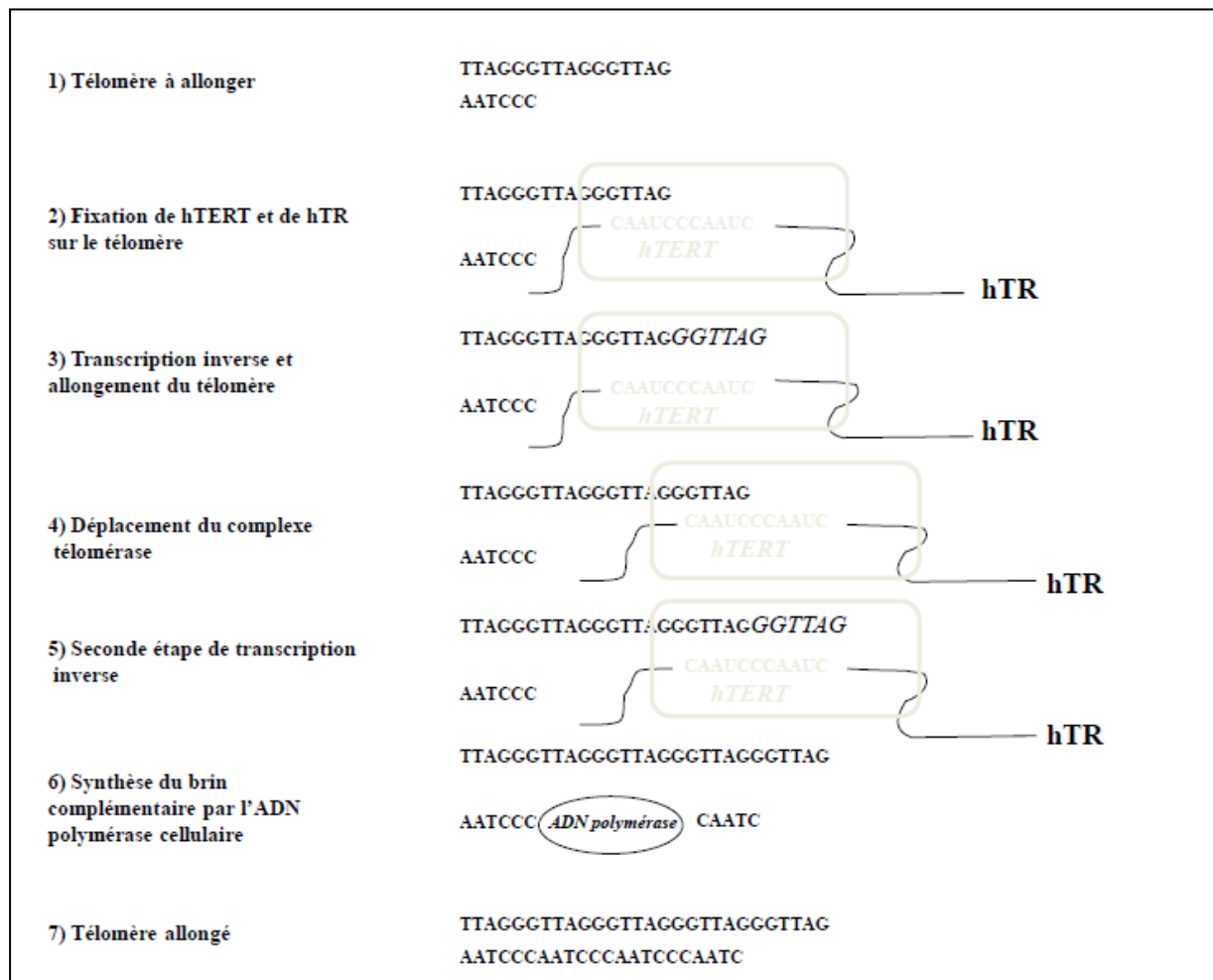
de l'amorce TS : 5'-AATCCGTCGACGAGAGTT-3' pendant une phase d'incubation de 20 à 30 min à 25°C. Par la suite la présence de Taq polymérase et de l'amorce CX : 5'-AATCCCATTCCCATTCCCATTCCC-3' permet l'amplification par PCR des produits formés par la télomérase. Il existe plusieurs techniques de détection de ces produits d'amplification qui vont permettre une mesure semi-quantitative ou quantitative de l'activité télomérase initiale.

TRAP semi-quantitatif

L'ajout d'un standard interne dans le milieu réactionnel permet d'obtenir une mesure semi-quantitative de l'activité télomérase. Ce standard est en effet formé d'une séquence nucléotidique flanquée en 5' et 3' des séquences complémentaires aux amorces TS et CX et sera donc amplifié de la même manière que le produit de la réaction de TRAP lors de la PCR. Ce standard étant ajouté en quantité équivalente dans le milieu réactionnel de chaque échantillon, il permettra non seulement de contrôler l'absence d'inhibiteurs de Taq polymérase dans l'extrait cellulaire, mais aussi de normaliser le signal issu de l'amplification des produits d'élongation de la télomérase. Plusieurs techniques permettent par la suite de détecter les produits d'amplification de la PCR comme l'ELISA ⁶².

TRAP quantitatif

Plus récemment, une technique de TRAP quantitatif a pu être développée grâce à l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel ⁶³. Ce test utilise le même principe que le TRAP classique, mais la phase d'amplification sera réalisée en PCR temps réel qui permettra la détection à chaque cycle des produits d'amplification grâce à la présence de SybrGreen I qui reconnaît les fragments d'ADN double brin. La réalisation d'une gamme étalon obtenue à partir de dilutions successives d'un échantillon de télomérase quantifié, permettra la quantification précise de l'activité télomérase contenue dans l'échantillon de départ.



Représentation schématique de l'allongement d'un télomère par le complexe télomérase.

Les télomères sont constituées de séquences répétitives TTAGGG et de protéines associées. Le complexe de l'enzyme télomérase est au minimum composé de deux sous-unités: une protéine (hTERT) et un ARN (hTR). hTR sert de matrice pour l'ajout de motifs répétitifs TTAGGG par la télomérase aux extrémités chromosomiques. Grâce à son activité reverse transcriptase, la télomérase catalyse l'addition des répétitions télomériques à l'extrémité des chromosomes sur le brin riche en guanine. Le brin complémentaire est ensuite synthétisé par l'ADN polymérase selon le processus normal de réplication de l'ADN.

Rôles de la télomérase

La fonction primordiale de la télomérase est le maintien de la longueur des télomères par ajout à leur extrémité de séquences répétées TTAGGG. En effet, dans des cellules dépourvues de télomérase, on assiste à un raccourcissement des télomères au cours des divisions cellulaires. Lorsque les télomères atteignent une taille critique, la cellule entre en sénescence répllicative, ce qui a pour effet de stopper sa prolifération et finalement d'aboutir à la mort de la cellule. Ainsi, les cellules à forte capacité proliférative, telles que les cellules progénitrices des tissus à renouvellement rapide comme la peau, le tube digestif et la moelle hématopoïétique, présentent une forte activité télomérase, alors qu'elle est très faiblement exprimée au sein des autres cellules somatiques, qui n'ont pas la nécessité de réaliser un nombre élevé de divisions cellulaires, comme les mastocytes matures ⁶⁴.

L'activation de la télomérase est le mécanisme de maintien de la longueur des télomères le plus fréquent dans les cellules tumorales humaines (85 à 90 % des cas), avec le plus souvent une surexpression de la sous-unité catalytique de l'enzyme ⁶¹. Cependant dans certains cas particuliers, on peut trouver des cellules immortelles ou tumorales sans activité télomérase détectable ^{65, 66}. Dans ce cas, il existe un mécanisme d'allongement alternatif des télomères, appelé ALT (Alternate Lengthening of Telomeres), mettant en jeu un système de recombinaisons. Des études ont en effet montré que l'élongation des télomères a lieu, dans ce cas, par hybridation d'un brin d'ADN d'un télomère sur le brin complémentaire d'un autre télomère ^{67, 68}, avec pour conséquence directe une très grande hétérogénéité de longueurs des télomères.

La sénescence proliférative : lorsqu'aucun mécanisme de maintien des télomères n'est mis en jeu, les extrémités télomériques raccourcissent à chaque répllication de l'ADN. Lorsque les

télomères atteignent une taille critique, les cellules arrêtent de proliférer (blocage en G1 du cycle cellulaire), et acquièrent une morphologie particulière (élargissement et aplatissement des cellules) avec des fonctions altérées et une induction de la SA- β -galactosidase, qui caractérisent un état de sénescence réplivative⁶⁹⁻⁷¹. Cet arrêt en G1 est induit par la répression de gènes de progression dans le cycle cellulaire, et par la régulation positive de gènes inhibiteurs tels que p21 et p16. La présence des suppresseurs de tumeurs pRB et p53 est nécessaire à l'entrée en sénescence⁷². L'expression ectopique de la télomérase permet d'éviter l'entrée en sénescence grâce à la prévention du raccourcissement télomérique, et donc l'immortalisation de lignées. Ce processus de sénescence devrait permettre à priori de protéger l'organisme de l'apparition de cancer en empêchant les cellules de réaliser un trop grand nombre de divisions cellulaires⁶⁹. Cependant des études montrent que l'état de sénescence s'accompagne d'une forte instabilité génétique. En effet, le raccourcissement des télomères induit une augmentation du nombre de recombinaisons non homologues avec fusions chromosomiques et fusions de chromatides sœurs, ce qui pourrait au contraire favoriser l'émergence de certains oncogènes⁷³.

Depuis une dizaine d'années, des travaux rapportent que des agents anti-tumoraux utilisés à des doses sublétales peuvent induire un phénotype de sénescence dans des fibroblastes humains en culture, plaçant ainsi la sénescence comme une nouvelle modalité de réponse cellulaire au stress^{74, 75}. Ces observations ont permis d'introduire le concept de sénescence prématurée induite par le stress. Les cellules entrant en sénescence prématurée induite par le stress présentent les mêmes caractéristiques que les cellules en sénescence réplivative, avec arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, raccourcissement des télomères, modifications morphologiques et expression de SA- β -galactosidase. Les causes de la sénescence prématurée induite par le stress ne sont pas encore élucidées.

La télomérase joue un rôle indirect dans le maintien des capacités prolifératives des cellules à long terme. En effet, l'absence de télomérase induit le raccourcissement des télomères et donc l'entrée en sénescence répllicative, ce qui provoque un arrêt de la prolifération par blocage du cycle cellulaire. Cependant, l'implication directe de la télomérase dans la réponse proliférative n'est pas encore clarifiée.

Outre son rôle connu dans le maintien des capacités prolifératives à long terme des cellules, ces dernières années, d'autres rôles ont été attribués à la télomérase, et notamment pour une très large part, dans la protection contre l'apoptose. En effet, de nombreux travaux montrent par inhibition ou surexpression de la télomérase, que cette enzyme intervient dans la protection contre divers stress, tels que le sevrage en sérum ou cytokine, l'exposition aux agents genotoxiques, aux radiations ionisantes, aux inhibiteurs d'histone deacétylases, ou aux ligands de mort⁷⁶⁻⁸⁰. Cependant, le ou les mécanismes par lesquels la télomérase agit contre l'induction de l'apoptose restent largement discutés.

La télomérase semble protéger les extrémités chromosomiques par sa simple localisation au niveau des télomères, en empêchant la reconnaissance par les systèmes de réparation des cassures doubles brins⁸¹. La télomérase entrerait donc dans la composition d'une coiffe télomérique protectrice. D'autre part, la télomérase semble être directement impliquée dans les processus de réparation de l'ADN. En effet, Masutomi et coll. ont pu montrer que l'inhibition de la télomérase était à l'origine d'une radiosensibilité accrue due à une diminution de la réparation des cassures doubles brins, comme le montre la diminution de la phosphorylation de γ -H2AX⁸². De même, hTERT serait impliquée dans le système NER (nucleotide excision repair), dans la réparation des dommages causés par les UV et dans le

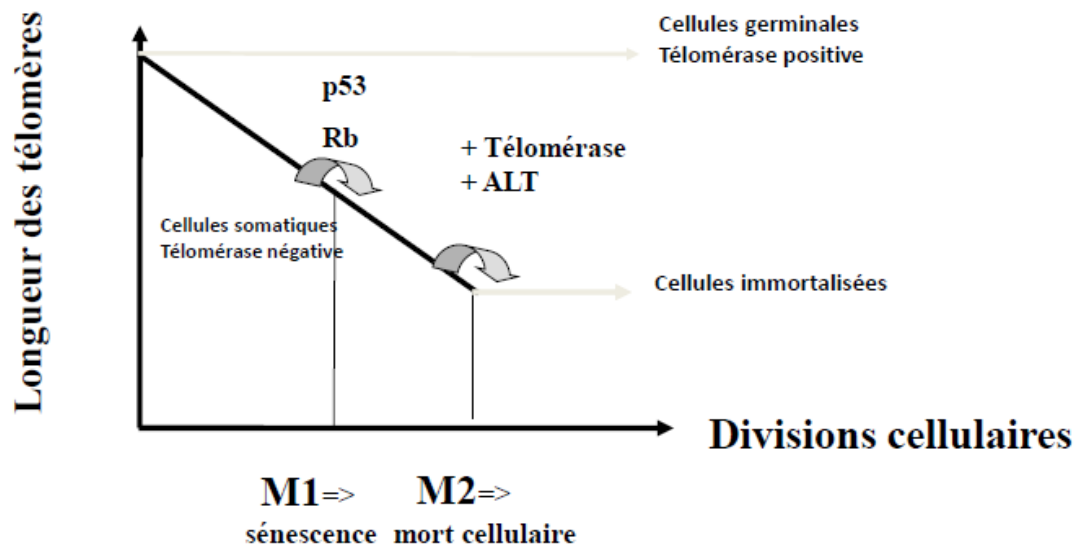
système NHEJ (non homologous end-joining) ⁸³. Cependant, les mécanismes par lesquels hTERT agit sur les voies de réparation de l'ADN ne sont pas encore totalement identifiés.

La télomérase semble de plus jouer un rôle dans le processus de différenciation. En effet, même si son effet reste encore controversé, des études montrent que la modulation de l'expression de la télomérase intervient dans la capacité de différenciation terminale des cellules. L'implication de la télomérase dans le processus de différenciation cellulaire semble être dépendante du type de tissus, et des études plus poussées permettront de déterminer plus précisément son mécanisme d'action.

Télomérase et cancer

A l'exception des cellules à fort renouvellement, les cellules somatiques présentent une activité télomérase quasiment nulle et ne possèdent donc pas de mécanisme de maintien de la longueur des télomères. En revanche, toutes les cellules cancéreuses possèdent un moyen d'éviter l'érosion télomérique, soit par le mécanisme d'ALT, soit grâce à la présence d'une activité télomérase élevée (85 à 90 % des tumeurs). L'expression ectopique de la télomérase permet en effet d'immortaliser les cellules somatiques normalement vouées à un nombre restreint de divisions cellulaires^{84, 85}, voire de les transformer lors d'une coexpression avec Ras ou l'antigène T du virus SV40. Ceci suggère un lien entre télomérase et cancer, et soulève la question de la dualité de cette enzyme vis-à-vis du processus de tumorigénèse. En effet, le statut de la télomérase ainsi que la longueur des télomères, peuvent apparaître à la fois comme un processus anti et pro-tumoral. Des études montrent que l'activité télomérase est très faible dans les lésions préumorales et qu'elle augmente lors de la progression tumorale⁸⁶⁻⁸⁸. De plus, dans la plupart des cellules cancéreuses, on observe la présence d'une activité télomérase élevée avec des télomères courts et de fréquentes anomalies cytogénétiques impliquant les télomères^{89, 90}. Ces données expérimentales permettent de proposer un modèle expliquant la dualité de la télomérase dans le processus de tumorigénèse. Lorsque les cellules somatiques, présentant une activité télomérase nulle ou très faible, réalisent un grand nombre de divisions cellulaires, on observe un raccourcissement des télomères, jusqu'à l'entrée en phase de sénescence, qui s'accompagne d'un arrêt net de la prolifération. A ce stade, il existe un point de contrôle impliquant p53 et la protéine Rb qui empêche les cellules de repartir en prolifération. Ainsi, la sénescence peut apparaître comme un mécanisme anti-tumoral qui bloque la prolifération des cellules ayant réalisé un trop grand nombre de divisions. En revanche, si malgré tout, une anomalie cellulaire permet à la cellule de passer ce point de

contrôle et de continuer à proliférer, le raccourcissement des télomères s'accroît et la cellule entre en phase de crise qui s'accompagne d'une très forte instabilité génétique. Lors de cette phase, un grand nombre de cellules entrent en apoptose, mais une partie d'entre elles acquièrent des mutations permettant l'expression d'oncogènes, et le rétablissement d'un mécanisme de maintien de la longueur des télomères avec une surexpression de la télomérase, ce qui peut aboutir à la naissance d'un clone cancéreux. Dans ce cas, la télomérase peut apparaître comme une protéine pro-carcinogène. Son rôle dans l'induction de la prolifération et la protection contre l'apoptose peut aussi participer à ce rôle carcinogène. Cependant, on sait que si les cellules expriment la télomérase avant le raccourcissement télomérique, celle-ci permet de protéger les extrémités des chromosomes et donc d'éviter l'apparition d'instabilité génétique. En effet, il a été montré que les modèles de souris invalidées pour la télomérase (souris mTERC^{-/-}), présentaient un plus grand nombre de tumeurs spontanées dues à l'instabilité génétique provoquée par l'absence de télomérase fonctionnelle⁹¹. Ceci porterait à croire que la télomérase n'est pas indispensable au processus de tumorigénèse et que le maintien des télomères peut être réalisé par d'autres mécanismes tels que l'ALT.



Graphique représentant la taille des télomères en fonction du nombre de divisions cellulaires pour différents types de cellules. A chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent. Quand les télomères atteignent une taille critique, le point de contrôle Mortalité 1 (M1) est atteint et la cellule entre en sénescence. Le point M1 peut être court-circuité par l'inactivation des voies p53 et /ou Rb. Dans ce cas, les cellules continuent de se diviser avec persistance de l'érosion des télomères. Lorsque ces dernières atteignent une taille critique, des événements comme cassure de l'ADN, recombinaison et fusion des extrémités chromosomiques peuvent survenir. Une telle instabilité génomique déclenche le passage au point de contrôle Mortalité 2 (M2) et entraîne la mort des cellules. De rares cellules en culture contournent le point M2 en activant le maintien des télomères par un mécanisme de maintenance: soit l'enzyme télomérase, soit un mécanisme de recombinaison appelé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres).

Télomères et stress

Des travaux d'Elisabeth Blackburn, prix Nobel 2009 de médecine sur les télomères, ont suggéré un impact de l'état psychologique sur le système télomères/télomérase. En effet, la longueur des télomères dans les cellules mononuclées du sang de patients soumis à un stress psychologique -patients dont les enfants étaient hospitalisés- était raccourcie par rapport à des contrôles sains appariés en âge et que leur activité télomérasique était plus faible ⁹². Depuis cette publication, l'équipe de Blackburn et d'autres équipes ont travaillé sur le lien entre le métabolisme des télomères et les troubles psychologiques ⁹³⁻⁹⁵.

Pathologies tumorales spontanément régressives chez les enfants

Les tumeurs pédiatriques cérébrales

Les tumeurs pédiatriques cérébrales sont un groupe hétérogène de tumeurs solides responsables d'une importante morbidité et mortalité en oncopédiatrie. Certaines d'entre elles ont la particularité est de régresser comme le neuroblastome de stade IVs ⁹⁶ ou encore certains gliomes pédiatriques de bas grade ⁹⁷. Par contraste, chez les adultes, les gliomes de bas grade évoluent souvent vers la progression ou la transformation en gliomes de haut grade ^{98, 99}. Ce phénomène très rare d'évolution différente entre des populations pédiatrique et adulte a fait émettre l'hypothèse d'une biologie différente.

Les leucémies transitoires

Les leucémies transitoires sont des formes de leucémie mégacaryoblastique survenant chez les enfants atteints de trisomie 21 et qui disparaît habituellement spontanément dans les 3 premiers mois de vie ¹⁰⁰. Une activité télomérasique a été retrouvée dans les cellules leucémiques des formes malignes de leucémie mégacaryocytaire, mais pas dans les formes bénignes de la maladie comme celles retrouvées au cours de la trisomie 21 ¹⁰¹. Ces résultats suggèrent que la présence de télomérase pourrait être un facteur déterminant de la transformation maligne des cellules leucémiques.

Tumeurs cérébrales pédiatriques

A la lumière des précédentes découvertes, le système télomère/télomérase a été étudié dans d'autres tumeurs pédiatriques ayant la particularité de régresser. Dans ces tumeurs, le métabolisme des télomères semble être impliqué : dans les gliomes de bas grade, la longueur des télomères est maintenue au cours du temps uniquement chez les patients avec des tumeurs agressives et récidivantes ¹⁰²; une activité télomérasique basse est un facteur prédictif de survie dans les épendymomes intracrâniens ¹⁰³; la sous unité hTERT est surexprimée dans les tumeurs neuroectodermiques ¹⁰⁴; enfin, deux équipes ont rapporté l'efficacité de molécules anti-télomérase sur des lignées tumorales issues de neuroblastomes et de tumeurs neuroectodermiques ^{104, 105}.

Au total, dans les tumeurs cérébrales pédiatriques régressives, il semble que le raccourcissement des télomères (l'absence de maintien de leur longueur) serait responsable de leur nature régressive par sénescence des cellules tumorales.

Les papuloses lymphomatoïdes

Les papuloses lymphomatoïdes font partie des lymphoproliférations primitives cutanées T CD30⁺ ¹⁰⁶. Cliniquement, c'est une pathologie chronique, récurrente et spontanément résolutive. Elle survient chez l'adulte avec un âge moyen de 45 ans et touche préférentiellement les hommes, elle se déclare rarement chez l'enfant ¹⁰⁷. Les lésions papuleuses, papulo-nécrotiques et ou nodulaires, prédominent sur le tronc et les extrémités, et disparaissent en général spontanément en 3 à 12 semaines. Les papulomatoses lymphomatoïdes ne sont présentes avec un réarrangement clonal du TCR dans près de 60% des cas, et dans 10 à 20% des cas, elle peut être précédée, associée ou suivie d'un autre type de lymphome comme le mycosis fongoïde, le lymphome anaplasique cutané ou le lymphome de Hodgkin ¹⁰⁸. Cependant, l'évolution diffère entre les adultes et les enfants : chez les enfants, la symptomatologie évolue sur plusieurs mois ou plusieurs années et peut régresser totalement et spontanément. Aucune transformation ou évolution maligne n'a jamais été décrite chez l'enfant. Chez les adultes, la symptomatologie peut devenir chronique jusqu'à 40 ans et peut s'associer dans certains cas à un lymphome agressif. Des travaux préliminaires montrent que les formes adultes semblent être associées à la présence de télomérase dans les lymphocytes pathologiques alors que dans les formes bénignes pédiatriques, il n'y a pas d'expression de la télomérase (J. Bruneau, manuscrit en préparation).

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Problématique

La mastocytose est un modèle d'une maladie de système qui est aussi une maladie clonale avec trois particularités intéressantes :

- les formes pédiatriques régressent spontanément à l'inverse des formes adultes qui ne régressent pas.
- les mutations de *c-Kit* diffèrent entre adultes, PTD et enfants ECD. Elles entraînent des voies de signalisation intracellulaires différentes. Et il existe une forte activité transformante des mutants ECD alors que les PTD présentent surtout une différenciation mastocytaire.
- Les adultes présentent de multiples troubles psychiques.

Le système télomères/télomérase est impliqué dans :

- la physiopathologie des cancers avec en particulier réactivation de la télomérase dans plus de 80% des cellules tumorales et à l'inverse absence d'activité télomérasique et raccourcissement des télomères dans les pathologies tumorales qui régressent spontanément.
- L'homéostasie psychique avec un raccourcissement des télomères chez les personnes soumises à un stress psychologique ainsi qu'une plus faible activité télomérasique que les contrôles.

Hypothèses

Concernant la différence d'évolution entre les enfants et les adultes atteints de mastocytoses, nous avons émis plusieurs hypothèses :

1) Peut-on impliquer le système télomère/télomérase dans la physiopathologie des mastocytoses, pour expliquer la régression chez les enfants et la progression chez les adultes ?

Ainsi, chez les adultes, les mutations PTD pourraient augmenter l'expression/l'activité de la télomérase et entraîner une stabilisation/rallongement de la longueur des télomères, favorisant l'immortalisation des mastocytes.

À l'inverse, les mutations ECD pourraient induire une intense prolifération de mastocytes tumoraux, sans réactivation de la télomérase et entraîner un raccourcissement des télomères et la sénescence des mastocytes pathologiques induisant une régression de la maladie à l'adolescence.

2) Peut-on expliquer la sévérité de certaines formes agressives chez l'adulte par une instabilité génomique favorisant l'apparition d'anomalies génétiques additionnelles ? Les mutations ECD et PTD induisent des phénotypes et des évolutions différentes vers la transformation. Les mutations PTD pourraient entraîner une instabilité génomique et favoriser l'apparition d'anomalies génétiques additionnelles.

3) Peut-on relier l'ensemble de ces phénomènes à une signalisation différentielle observée entre les mutations ECD et PTD et les deux évolutions de la maladie ? Nous tenterons de relier ou d'identifier les voies/effecteurs initiateurs de ces phénomènes.

Les retombées, à terme, étant de déduire de nouvelles cibles/stratégies thérapeutiques pour le traitement de cette maladie incurable chez l'adulte.

Concernant les troubles psychologiques rencontrés chez les adultes atteints de mastocytose :

L'érosion télomérique est associée au vieillissement cellulaire, qui lui-même est accru en cas de stress psychologique. Mastocytose et vieillissement cellulaire sont tous deux associés à la présence d'émotions négatives. Comme les mastocytes semblent être impliqués dans les réactions émotionnelles, nous avons émis l'hypothèse que la mastocytose pourrait constituer un modèle pour étudier les relations entre les processus impliqués dans le raccourcissement des télomères et la production d'émotions négatives comme le stress, la dépression, l'anxiété et des déficits de régulation émotionnelle.

Ainsi, nous avons étudié le système télomère/téломérase chez des adultes atteints de mastocytose afin de vérifier si l'association entre l'émotivité et la longueur des télomères était plus forte dans cette pathologie que dans une population stressée mais indemne de mastocytose.

RESULTATS

- 1. Travail sur la différence d'évolution de la maladie entre les enfants et les adultes.*

Title:

The differential expression of telomerase between pediatric and adult forms of mastocytosis could explain the spontaneous regression of the disease only among children.

Authors:

S. Georgin-Lavialle^{1,2,3,*£}, J. Bruneau^{1,4,*£}, I. Draskovic⁵, G. Soler^{6,*}, T. Le Guen^{7*}, S. Letard⁸, L. Lhermitte^{1,*}, K. Hanssens^{8,9}, A-L. Gacon^{1,*}, G. Damaj¹⁰, S. Barete^{3*}, L. Martin¹¹, I. Cruz-Moura^{1*}, D. Canioni^{1,4,*}, Y. Lepelletier^{1,*}, I. Cruz-Moura^{1,*}, F. Feger^{1,*}, C. Baude⁹, S. Romana^{13,*}, O. Lortholary^{3,14,*}, O. Tournilhac¹⁵, A. Londono-Vallejo⁵, V. Asnafi^{3,1}; S. Fraitag^{3,4}, C. Bodemer^{3,16}, A-S. Gabet^{1,*}, P. Dubreuil^{3,8,9§}, O. Hermine^{1,2,3,*§}.

¹CNRS UMR 8147

² Service d'hématologie adultes

³Centre de référence des mastocytoses

⁴ Service d'anatomopathologie

⁵ Laboratoire Télomères et Cancer, UMR3244-Pavillon Trouillet-Rossignol, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

⁶Laboratoire de cytogénétique et INSERM U E 0210, Hôpital Necker-Enfants malades ; Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

⁷INSERM U768

⁸UMR599, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Laboratoire d'Hématopoïèse Moléculaire et Fonctionnelle, Marseille, France

⁹AFIRMM (Association Française pour les Initiatives de Recherche sur le Mastocyte et les Mastocytoses), 3 Avenue George V, 75008 Paris, France

¹⁰Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens, France

¹¹ Service de dermatologie, CHU Angers

¹²Laboratoire d'hématologie biologique

¹³ Laboratoire de cytogénétique humaine

¹⁴Service de maladies infectieuses

¹⁵Service d'hématologie, CHU Clermont Ferrand, 58 rue Montalembert, 63003 ***Clermont-Ferrand, France***

¹⁶ Service de dermatopédiatrie.

* Faculté de Médecine; Université Paris V René Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France.

£ Both authors contributed equally to this work

§ Both authors codirected the work

Corresponding authors:

Pr. Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Université Paris Descartes, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France; Tel: +33 144 495 386; Fax: +33 144 495 280; e-mail: ohermine@gmail.com

or Patrice Dubreuil, INSERM, U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Signalisation, Hematopoiesis and Mechanisms of Oncogenesis, 27 boulevard Leirou, Marseille, F-13009, France; Phone: 33 (0) 491 758 418; Fax: 33 (0) 491 260 364; e-mail: Patrice.Dubreuil@inserm.fr

Word counts: 2365

Key words: mastocytosis, telomere, telomerase, ALT, CGH, *c-Kit*, mast cell, senescence.

Abstract (303 words)

Mastocytosis is a heterogeneous disease characterized by mast cells accumulation in one or several organs. The c-Kit tyrosine kinase receptor is expressed on mast cells. Adults with mastocytosis usually present D816V *c-Kit* mutations, allowing MC survival and proliferation; whereas children usually present *WT c-Kit* or mutations between exon 7-11. Mastocytosis usually regresses among children but never among adults. Telomeres shorten after each cellular division, leading to senescence. Thus, telomerase can elongate telomere. In most cancers, telomerase reactivation or an alternative pathway confers tumoral cells immortality by elongating telomere. We hypothesized a telomerase involvement in mastocytosis physiopathology, to explain why the disease usually regresses among children and not among adults. Cutaneous biopsies of 48 adults and 60 children with proven mastocytosis were studied; hTERT (telomeric catalytic subunit) expression was studied by RTQ PCR and was significantly higher among adults than among children ($p= 0.0125$). Immunohistochemical double staining of hTERT and c-Kit among 15 adults and 16 children revealed that adults coexpressed significantly more hTERT and cKIT than children ($p=0.0229$). Medullar mast cells from patients with mastocytosis present a telomerase activity when compared to normal control mast cells. We also showed that mouse bone marrow mast cell infected with the pediatric *c-Kit* mutation underwent more senescence and had shorter telomere than cells infected with the adult *c-Kit* mutation. We then show that in aggressive forms of mastocytosis, such as sarcoma, telomerase is not expressed, but an alternative length telomere mechanism can occur as well as genomic instability. Our results show that cutaneous mast cells express significantly more telomerase in adult mastocytosis forms than in children forms. We provide *in vivo* and *in vitro* clues that, pediatric mastocytosis could spontaneously regress by mast cell telomere shortening during adolescence without telomerase expression; whereas adult mast cell lifespan could be extended by a telomerase expression or alternative length pathways.

Introduction

Mastocytosis is a heterogeneous group of clinical disorders characterized by the abnormal accumulation of mast cells in various tissues, especially the skin and hematopoietic organs¹⁻³. The typical presentation of childhood-onset mastocytosis includes cutaneous manifestations and usually has a good prognosis, with substantial improvement or spontaneous resolution before puberty. In contrast to childhood-onset mastocytosis, adult-onset mastocytosis often persists for the lifetime of the patient. Adult mastocytosis is related to the clonal proliferation of mast cells secondary to a gain-of-function of the proto-oncogene *c-Kit*. Thus, adult mastocytosis is considered as a clonal myeloproliferative disorder. Our team previously published that, despite the high rate of spontaneous regression, childhood mastocytosis is also a clonal disease associated with activating mutations in *c-Kit* and not a reactional disease as it used to be admitted⁴. Surprisingly, the localization of *c-Kit* mutations differs between adults and children, adults bearing mostly intracellular *c-Kit* mutations located on exon 17 and affecting the phosphotransferase domain of the receptor (PTD); whereas children mostly bear *c-Kit* mutations between exons 7-9 affecting the extracellular domain of the receptor (ECD). Thus, both diseases (adult and children) are clonal diseases, but there is no explanation why the disease regresses only among children.

Telomeres are specialized nucleoproteic structures that cap and protect the ends of chromosomes^{5,6}. They can be elongated by the telomerase enzyme, but in telomerase negative cells, telomeres shorten after each cellular division because of the end replicating problem⁷. This phenomenon leads ultimately to cellular senescence, conferring to the telomeres a role of biological clock⁸. However, rare cultured cells become immortalized by a recombination-based mechanism to maintain telomere length called ALT (Alternate Lengthening of Telomeres)⁹. Promyelocytic leukemia (PML) bodies are dynamic nuclear structures implicated in a wide variety of cellular processes. ALT-associated PML bodies (APBs) are

specialized PML bodies found exclusively in telomerase-negative tumors in which telomeres are maintained by recombination-based alternative (ALT) mechanisms: there is an association between the presence of APBs and the utilization of ALT for telomere maintenance ¹⁰.

As mature mast cells do not express telomerase ¹¹, we hypothesized that among children, mast cells do not express telomerase and die by replicative senescence inducing the regression of mastocytosis lesions at puberty; whereas among adults, tumoral mast cells express telomerase and expend their lifespan or even get immortalized, thus inducing the persistence of the disease.

Our objective was to show, *in vivo*, that pathological mast cells from adults and children with mastocytosis differ by their expression of telomerase only in adult forms; and that this difference could be due to the difference of *c-Kit* mutations observed between adults and children. Thus, MC of children presenting ECD *c-Kit* mutations would not express or reactivate telomerase and bear shortened telomeres; whereas adults MC presenting PTD *c-Kit* mutations would express telomerase and lengthen their telomeres.

Results

We firstly studied children and adults cutaneous biopsies, infiltrated by pathological mast cells (figure 1). We showed that hTERT expression by RT QPCR was significantly increased among adult patients (n=40) when compared to children (n=58) (figure 1). This was confirmed by immunohistochemistry: we found that hTERT was significantly increased among adults (n=15) when compared to children (n=16). In addition, we found that hTERT was more expressed among patients with the PTD *c-Kit* mutation when compared to patients without PTD *c-Kit* mutations.

Secondly, we measured the relative telomerase activity (RTA) of several cellular populations and compared them: isolated mast cells and hematopoietic CD34⁺ precursor from bone marrow of patients with mastocytosis and bearing PTD *c-Kit* mutations as well as healthy controls (figure 2). We also measured RTA of mature human primary mast cells. As previously reported, there was no telomerase activity in mature mast cells¹¹. But, interestingly, mature medullar mast cells from patients presented a RTA even if it was lower than the RTA observed in hematopoietic precursors. This suggests that the mast cells of adult with PTD *c-Kit* mutations express telomerase and could have an increased lifespan compared to normal mast cells.

Thirdly, to test this hypothesis, murine bone marrow mast cells (BMMC) were transfected with one ECD *c-Kit* mutant (del 417-419 InsY) or with the PTD *c-Kit* mutation (D816V) (figure 3). We studied the senescence of these cells compared to untransfected BMMC's cells cultured with Interleukine 3 or SCF. We showed that BMMC's transfected with the PTD *c-Kit* mutations were significantly less senescent than BMMC's transfected with the ECD *c-Kit* mutations. And BMMC's transfected with the PTD *c-Kit* mutations were similarly senescent than untransfected BMMC's only cultured with Interleukine 3 without SCF adjunction. We performed Q FISH on these BMMC's in order to measure the telomere length (figure 4). We

showed that the telomere length of BMMC's transfected with the PTD *c-Kit* mutation hold significantly longer telomere than BMMC's transfected with the ECD *c-Kit* mutation and WT BMMC's.

In our hypothesis, the pediatric forms of mastocytosis bearing WT *c-Kit* or ECD *c-Kit* mutations would not reactivate hTERT, leading to mast cell proliferative senescence. But interestingly, we followed two adult patients with mast cell sarcoma, which is a very aggressive form of mastocytosis and died a few months after the diagnosis of mastocytosis. We suspected a strong telomerase activity but we did not find telomerase expression in their sarcoma tissue.

The first patient, Mr L. bore a *c-Kit* mutation in exon 10 but hTERT expression was neither detected by immunohistochemistry nor by Q TRAP on a tissular piece of the sarcoma biopsy (figure 5). Considering the absence of telomerase activity but the highly proliferative evolution of the sarcoma, expressing Ki67, we decided to look for an alternative telomere lengthening (ALT) among his pathological mast cells (figure 6). We looked for ALT among this patient's tumoral mast cells and compared to mast cells of a patient with PTD *c-Kit* mutations. TRF 2 and PML colocalized in the nucleus of Mr L.'s mast cells, thus indicating an ALT phenomenon (figure 6). This result suggest that pathological mast cells bearing ECD *c-Kit* mutations do not reactivate telomerase but are able to lengthen telomere by an alternative pathway, leading to expanded lifespan.

The second patient, Mr B., was *c-Kit* WT and did not express hTERT in the skin or the sarcoma (figure 7). We used Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) to examine copy number alterations (CNA) in DNA from this patient: we analyzed bone marrow sample and mast cell sarcoma separately. Bone marrow samples from two patients with indolent systemic mastocytosis were also analyzed as control samples. For all samples, small

sized CNA were detected and identified as copy number variations as reported in the Database of Genomic Variants. Any copy number change was observed in control samples from patients with non-aggressive form of mastocytosis. In contrast, the mast cell sarcoma from patient B exhibited large and complex CNA whereas bone marrow sample did not show any chromosomal imbalance. Total number of CNA > 2Mb was 28 in the sarcoma sample and there were 3 whole chromosome gains or losses (figure 8).

Discussion

Mastocytosis is a heterogeneous disease characterized by an abnormal accumulation of tissue mast cells in one or more organs. Compared with adults, pediatric mastocytosis has a relatively favorable prognosis with frequent complete regression in adolescence ⁴. In this study, we show that the telomerase catalytic subunit, hTERT, is significantly more expressed in mast cells of adult patients with mastocytosis in comparison with children suffering from mastocytosis. To our knowledge, this is the first demonstration that telomerase activity is correlated with non regressive forms of mastocytosis, such as adult mastocytosis, in comparison to children-onset-mastocytosis. The increased expression of hTERT could confer increased lifespan to the pathological mast cells which proliferate in mastocytosis. This could explain why the disease does not regress among adults; whereas among children, pathological mast cell express less telomerase, undergo normal replicative senescence, which could explain why the disease spontaneously regress among children.

To test this hypothesis on a large cohort of patients, we chose cutaneous biopsies because it is the only tissue available among children suffering from mastocytosis. Indeed, the disease is almost only cutaneous among children, whereas it can be systemic and affecting various organs including the skin among adults. We then selected the biopsies that were the most

infiltrated by pathological mast cells after histological examination (> 70% dermal infiltration), so that hTERT expression measured by RT Q PCR could reflect hTERT expression by mast cells. We decided to compare the hTERT/ c-Kit ratio in order to really study hTERT expression by cutaneous mast cells.

The immunohistochemistry study was also performed on cutaneous biopsies selected for their strong pathological mast cell infiltration in order to be able to count double positive hTERT⁺ c-Kit⁺ cells. The cKit staining was membranous whereas hTERT staining was intracellular. Indeed, it was then easy to detect double positive cells and count their percentage on the biopsy. To explain why hTERT is not absent but only decrease among children when compared to adults, we could imagine that pediatric mast cells still express telomerase because cells are very young when children –onset-mastocytosis begins. Another explanation would be that children skin is more infiltrated than adults by normal mast cells which are recruited by the pathological mast cells and that only pathological mast cells (and not normal mast cells) express hTERT.

The measure of telomerase expression in medullar mast cells of patients with mastocytosis was performed prospectively when new adult patients were diagnosed. We had not access to children bone marrow because pediatric mastocytosis is almost only a skin disease and bone marrow aspiration is never performed on them and is not necessary for the diagnostic of mastocytosis among children. This experiment shows that in contrast with normal mature mast cells, medullar mast cells from patients with mastocytosis hold a telomerase activity, which suggests that their telomerase is active to lengthen telomere or maintain their length. Further experiments could be useful, such as the measurement of the telomere length of medullar mast cells of these patients compared to mature control mast cells. Thus, this would require fresh bone marrow with intense mast cell infiltration in order to

isolate this population. No pediatric control could be compared, because children do not undergo bone marrow aspiration.

We hypothesized that the differential hTERT expression between adults and children could be related to the differential *c-Kit* mutations observed between them, because PTD *c-Kit* mutations are preferentially found among adults whereas ECD mutations exist preferentially among children ⁴. Indeed, the PTD *c-Kit* mutation could be responsible for hTERT reactivation among adults, thus reducing cellular senescence whereas the ECD *c-Kit* mutation would not promote hTERT reactivation, thus leading to normal cellular senescence. We tested this hypothesis by using primary mouse bone marrow mast cells and not cell lines which often express telomerase. The results of the senescence assay confirmed our hypothesis by showing that BMMC infected with ECD *c-Kit* mutation are more senescent than BMMC infected with the PTD *c-Kit* mutation. To assess this hypothesis, we measured the telomere length in these BMMC's by QFISH (figure 4). We found that telomere length was significantly shortened in *c-Kit* WT BMMC's and ECD *c-Kit* BMMC's mutant compared to BMMC's holding PTD *c-Kit* mutation.

Surprisingly, we followed two adult patients without PTD *c-Kit* mutations but presenting an aggressive mast-cell disease: mast cell sarcoma and who did not express telomerase by immunohistochemistry in the tumor. Two phenomenon could be responsible for the oncogenic evolution of the mast cell tumor: either an ALT, as seen in our patient Mr L, or genetic instability consecutive to telomere erosion resulting in chromosomal deletions on additions as seen in our patient Mr B (figure 8). This model could constitute a paradigm for oncologic diseases that spontaneously regress such as cerebral pediatric tumors ¹².

Unfortunately, these two patients died rapidly after the diagnosis.

Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) is able to detect genomic copy number changes in small clonal populations. This technique could allow screening of

genome-wide aberrations in tumor samples without cell culture requirement. In hematological malignancies, aCGH has led to the identification of genomic alterations, some of particular complexity, unexplored by others technologies with specificity and of high resolution. The mast cell sarcoma from patient B exhibited large and complex CNA whereas bone marrow sample did not show any chromosomal imbalance. Total number of CNA > 2Mb was 28 in Mr B's sarcoma sample and there were 3 whole chromosome gains or losses. Here we show that mast cell sarcoma it is characterized by a high level of genomic alterations that could participate to the high severity of this form of mastocytosis. Mast cell's telomere may have been so shortened, that chromosomal recombination happened leading to chromosomal instability.

These results could be confirmed by measuring the telomere length of pathological cutaneous mast cells of adults and children, but the normal telomere length of normal mast cells is unknown as well as the physiological expected difference between children and adult mast cells. The link between the different *c-Kit* mutations and hTERT promoter should be investigated.

Finally, we propose that PTD *c-Kit* mutations, encountered among adults with mastocytosis promote hTERT expression and increase lifespan of pathological mast cells in comparison with ECD *c-Kit* mutations encountered in mast cells of children with pediatric-onset mastocytosis, which could lead to telomere shortening and cellular senescence. Unless in rare adults cases, in absence of either PTD *c-Kit* mutations or hTERT expression, telomere can be lengthened by an ALT mechanism or by chromosomal instability induced by critically telomere shortening (figure 9). Yang et al previously showed that ECD *c-Kit* mutations seem very oncogenic with high transforming capacities whereas PTD *c-Kit* mutations have a limited oncogenic activity and low aggressivity¹³. Our result could explain why the adult disease associated to PTD *c-Kit* mutations induce mostly

an indolent disease whereas the pediatric disease is either spontaneously regressive or in rare cases, very aggressive because of the 2 mechanisms that we have highlighted in this study (ALT or chromosomal instability).

Our results could be extended to other myeloproliferative disorders, especially those associated to tyrosine kinase activation. Patients with indolent or regressive disease may present no telomerase activation in contrast to patients with aggressive disease. Thus, therapeutic options may emerge from these results by using antitelomerase molecules to stop or delay the disease severe evolution.

Materials and Methods

Patients

We assessed patients with childhood-onset cutaneous mastocytosis and adult mastocytosis in a multicenter clinical study. Mastocytosis was suspected by the presence of a positive Darier's sign and was confirmed by histological analyses. Mastocytosis diagnosis was defined by the WHO criteria. The children cohort was previously described by Bodemer *et al.*⁴. Parents of the children signed the informed consent and authorization form for the study protocol, including genetic analysis, and 2-mm biopsies were collected from a cutaneous lesion after informed consent was obtained. All patients were included in "mastocytosis pathophysiological study", which started in 2003 and is sponsored by AFIRMM (Association Française pour les Initiatives et la Recherche sur le Mastocyte et les Mastocytoses) promoter. The study was approved by Necker hospital ethical committee, and carried out according to the Helsinki convention. Each patient provided informed consent. The result of *c-Kit* gene sequencing looking for D816V mutation in skin and/or bone marrow was available.

Mutation screening

Total RNA was extracted from cutaneous biopsies using an RNeasy mini kit (Qiagen S.A.). RNA was reverse-transcribed into cDNA using a StrataScript first-strand synthesis system (Stratagene) and random hexamer primers in a total volume of 25 µl according to the manufacturer's instructions. Next, the *c-kit* coding sequence was amplified from 2.5 µl of the cDNA by polymerase chain reaction (PCR) using HotStarTaq™ DNA polymerase (Qiagen S.A.) and the primers listed in the Supplemental Data for 40 cycles at 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 45 s. For specific detection of mutations at codon 816, primers U2 and L1

were used. The PCR products were purified using a GeneClean III kit (Qbiogene), and the entire *c-kit* coding region was directly sequenced using a BigDye terminator V 1.1 kit (Applied Biosystems), the sequencing primers listed in the Supplemental Data, and an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems). Because mast cells are the main source of *c-kit* mRNA in mastocytosis lesions, the presence of both mutant and wild-type sequences indicates either heterozygosity or a nonclonal mast cell population in biopsies. The D⁸¹⁶V mutation was also confirmed by PCR amplification of the *c-kit* coding sequence using fluorescent primers U2F and L1F (see Supplemental Data), followed by restriction digestion using *BsmA1* and *Ple1*, which detect the wild-type and mutant forms of *c-kit*, respectively. The restriction fragments were separated on an ABI Prism 3100 16-capillary sequencer, and the size of the restriction fragments was determined by comparison with the sizes of Genescan ROX 500 markers (Applied Biosystems) using GeneMapper software (Applied Biosystems).

Real-time quantitative RT-PCR

We used a RQ-PCR assay based on TaqMan fluorescence methodology to quantify the full range of hTERT mRNA copy numbers. This method used a dual-labeled nonextendable oligonucleotide hydrolysis (TaqMan) probe in addition to the two amplification primers. The probe contained 6-carboxyfluorescein (FAM) as a fluorescent reporter dye, and 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) as a quencher for its light emission spectrum. During the extension phase of PCR, the probe hybridized to the target sequence and was then cleaved due to the 5' to 3' exonuclease activity of *Taq* polymerase. The increase in the fluorescence signal of the reporter was proportional to the amount of specific PCR products, providing highly accurate and reproducible quantification. The number of PCR cycles to reach the fluorescence threshold was the cycle threshold (Ct). The Ct value for each sample was proportional to the log of the initial amount of input cDNA. By plotting the Ct value of

an unknown sample on the standard curve, the amount of target sequences in the sample could be calculated. To normalize the hTERT mRNA expression for sample-to-sample differences in RNA input, RNA quality, and reverse transcriptase efficiency, we amplified the housekeeping gene *ABL*. According to each standard curve, we got the copy numbers of *ABL* and hTERT, respectively. The ratio between copy numbers of hTERT and *ABL* represented the normalized hTERT (NhTERT) for each sample and could be compared with that of other samples.
$$\text{NhTERT} = (\text{hTERT mRNA copies sample} / \text{ABL mRNA copies sample}) \times 100.$$
 We performed the same ratio for c-Kit expression, normalized by *ABL*. The taqman 7700 machine was operated. The number of PCR cycles was 50 and PCR reaction volume 25 μL . For analysis, threshold value of 0.1 was used with automatic baseline.

Primers and probes: the nucleotide sequences of oligonucleotide TaqMan probes and primers are the following: hTERT: Upper primer 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3'; Lower primer 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'; Probe 5'-(FAM) ACCCTGGTCCGAGGTGTGTCCCTGA (TAMRA)-3'. For c-Kit: upper primer (AS): GGCTGCCAAGTCTCTGTGAAT; Lower primer (S): CGAGTTGGCCCTAGACTTAGAAGA; Probe: Fam-AAAGGGCATGGCTTTCCTCGCC-Tamra. For Abl: upper primer (AS): GATGTAGTTGCTTGGGACCCA; lower primer (S): TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT; probe: Fam-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-Tamra.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed-embedded tissue sections were incubated in pretreatment citrate buffer for antigen retrieval and were then reacted with monoclonal anti-human CKIT (polyclonal, DAKO, dilution 1/400) and anti-human HTERT (Clone 2D8 (ref. LS-B95), LifeSpan Biosciences, dilution 1/1000) according to the Menarini Diagnosis automated system protocol

as recommended by distributor with double staining kit (referenced Bond polymer detection kit Alkaline Phosphatase Red 41238, and DAB 37072). The best combination of reading results was CKIT antigen revealed in red by alkaline phosphatase detection kit and HTERT antigen in brown by DAB detection kit. Double stained cells CKIT⁺ / HTERT⁺ were counted on at least 5 high power fields (magnification x400) and the percentage has been assessed against the single CKIT positive cells and HTERT negative.

PBMC isolation and cell sorting and Q TRAP reaction

Blood was collected on heparinized tubes and PBMC were isolated by Ficoll-IPaque gradient (Amersham Life Science, U.K). PBMCs were stained using: CD34 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), CD45 phycoerythrin (PE); and CD117/c-Kit (APC). Medullar cells were stained with CD34-FITC, c-Kit-APC and CD45-PerCP (Beckton Dickinson). Medullar mature mast cells were c-Kit⁺CD34⁻CD45^{low} and were sorted on a BD Aria 1[®] FACS sorter and cultured on 96 well plates in 200 µL of IMDM medium. Medullar hematopoietic cells were CD34⁺ c-Kit^{+/+}. Mature mast cells were cultivated after isolation and culture of the medullar precursor CD34⁺CKit⁺ in adequate medium for 8 weeks (Arock).

Telomerase activity measurement(Q TRAP)

After isolation, 2×10^5 cells were washed twice in 1X PBS and thus were lysed. QTRAP assay was performed on the protein extract as described by the Allied Biotech® Quantitative Telomerase Detection kit. The measure was done in triplicate and the mean was calculated. For each sample, the result was expressed in relative telomerase activity, after comparison with the result found for the positive control provided by the manufacturer.

BMMC's infection and betagalactosidase assay

BMMCs were derived from femurs of 2-mo-old male mice. Bone marrow cells were cultured at a starting density of 2×10^5 cells/ml in Optimem medium supplemented with L -glutamine, penicillin, streptomycin, 10% fetal calf serum (Invitrogen), and 2 ng/ml murine recombinant IL-3 (Immugenex). The medium was renewed every 5–7 d. Cells were used after their differentiation into MCs, which occurred after at least 28 d in culture. At monthly intervals, BMMCs were deprived of IL-3 to assess the acquisition of growth-factor independency.

Senescence associated β -galactosidase assay

Equal number of BMMC control and BMMC infected with various c-Kit mutant (D816V-PTD and Val 419 Asp- ECD) were plated in 48 holes plates for the senescence associated β -galactosidase staining kit (Cell signaling, ref 9860). Cells were fixed and stained with X-gal for detection of β -galactosidase activity using a senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling). Cells exhibiting positive β -galactosidase activity (turned blue) at pH 6.0 were counted under a light microscope.

FISH

BMMC's were cytopspined on slides. Air-dried slides were hydrated before fixation in 4% (vol/vol) formaldehyde, washed, and treated with pepsin. The formaldehyde fixation and washes were repeated, and the slides were dehydrated and air-dried. A hybridization mixture containing 70% (vol/vol) formamide, 0.3 μ g/mL Cy3-(C3TA2)₃ PNA probe (Panagene), and 1% (wt/vol) blocking reagent was added. DNA was denatured by heat. After hybridization, slides were washed with 70% formamide and 10mMTris and with 0.05MTris, 0.15 M NaCl, and 0.05% Tween-20. Slides were then dehydrated in ethanol, air-dried, and covered by antifade solution. Quantitative Analysis of Digital Images. Blue (DAPI) and red (Cy3) fluorescence signals were captured by a CCD camera. Merged pseudocolor images were used

to identify chromosomes based on DAPI. To estimate total telomere fluorescence intensity in FISH experiments, 20–30 metaphases per preparation were captured and stored. National Institutes of Health software (Image J) was used for the quantitative analysis of images. Correction for uneven illumination of the slide was introduced using the pseudoflat field plugin. The telomeric signal intensity was obtained by subtracting the mean pixel value associated with the interstitial regions of chromosomes from the mean pixel value for each telomeric spot.

Detection of APBs by Indirect Immunofluorescence

Fifty thousand cells from Ficoll treated blood preparations were spotted on glass slides using Cytospin and frozen at -80°C. For the colocalization studies, slides were equilibrated to room temperature and pre-extracted for 5 min in Solution T (0.5% Triton-X-100, 50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 300 mM sucrose). Pre-extracted cells were fixed for 15 min in Solution F (3% formaldehyde, 1x PBS, and 300 mM sucrose), washed three times with PBS and permeablized for 10 min in Solution T. For the detection of APBs, fixed cells were first blocked with 10% horse serum in PBS and then incubated sequentially in a blocking buffer containing mouse anti-TRF2 (IMG-124A, 1/500), rabbit anti-PML (ab53773, 1/1000) and secondary antibodies (a mixture of donkey anti-mouse Alexa 488 and donkey anti-rabbit Alexa 594, both Invitrogen, 1/400). All incubation steps were done in a humid incubator at 37 °C for 30 min. Slides were mounted in Vectashield with 0.2 g/mL 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were taken with a 3D deconvolution microscope (Nikon 80i) using the MetaMorph software. Final images are composed of arithmetic stacks of 20–30 deconvolved images, each 0.2 µm in depth.

Array Comparative Genomic Hybridization analysis

Genomic DNA from the mast cell sarcoma was extracted using the Puregene Genomic DNA Purification kit (Gentra) according to the manufacturer instructions. For bone marrow, blood and tissue samples, mononuclear cells were enriched first using Ficoll separation procedures then genomic DNA were extracted by phenol-chloroform following standard protocol. Besides our patients, we also analyzed bone marrow or peripheral blood mononuclear cell samples from two others individuals with indolent systemic form of mastocytosis as control samples. Patient samples were analyzed using 244K human microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). DNA digestion, labeling and hybridization for the microarrays were performed according to the manufacturer instructions. Briefly, 500 ng of genomic DNA from patient samples and gender matched reference samples (Promega, Madison, WI) were digested with AluI and RsaI enzymes at 37°C for 2 hours. The labeling reaction was performed using the Labeling Reaction kit from PerkinElmer at 37°C for 2 hours. Patient sample and reference sample for each reaction were then pooled and purified using Microcon column, and then incubated with human Cot-1 DNA, hybridization buffer and blocking agent following manufacturer instructions (Agilent Technologies). The samples were hybridized on Human 244K microarrays for 40 hours at 65°C and washed according to the manufacturer protocol. Slides were scanned by using Genepix 4000B scanner (Axon Instruments, Union city, CA) and data were extracted using Agilent Feature Extraction software. Raw data text files were then imported for analysis into CGH Analytics software (Agilent Technologies) and aberrations were detected with the ADM2 algorithm, and filter aberration was set to 5 consecutive clones with AbsLogRatio > 0.2.

Statistical analysis

Statistical comparisons between characteristics of children and adults with mastocytosis were based on unpaired t test. All reported p values were two tailed with confidence intervals of

95% and p value <0.05 was considered significant. Data were analyzed using GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Acknowledgments

S. G-L is a recipient from a grant from the Société Nationale Française de Médecine Interne (bourse SNFMI-Genzyme maladies rares).

S.G-L and J.B are supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

This work was partially financed by AFIRMM (Association Française pour la recherche sur le mastocyte et la mastocytose), by INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée PD) and ANR-MRAR (Agence Nationale pour la Recherche, grant Maladies Rares – PD and OH), by Institut National du cancer INCa (PD).

References

1. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Swee RG. Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1988;67:345-68.
2. Arock M, Valent P. Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives. *Expert review of hematology*;3:497-516.
3. Valent P, Akin C, Escribano L, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435-53.
4. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *The Journal of investigative dermatology*;130:804-15.
5. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661-73.
6. Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 1989;31:553-60.
7. Blackburn EH, Challoner PB. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 1984;36:447-57.
8. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* 1965;37:614-36.
9. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer letters* 2003;194:155-62.
10. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer research* 1999;59:4175-9.
11. Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM, et al. Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines. *J Immunol* 2001;166:6647-56.
12. Tabori U, Dome JS. Telomere biology of pediatric cancer. *Cancer investigation* 2007;25:197-208.
13. Yang Y, Letard S, Borge L, et al. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood*;116:1114-23.

Figure legends

Figure 1. Differential hTERT expression among adults and children with mastocytosis.

Panel A shows the results of RT Q PCR performed among RNA extracted from cutaneous biopsies of adults (n=48) and children (n=60). Results are expressed in percentage of the hTERT/c-Kit ratio. Panel B shows the results of the double staining hTERT and c-Kit by immunohistochemistry between adults and children. Panels C and D show the results of double staining hTERT and c-Kit on cutaneous biopsy of adults (panel C, expressing D816V *c-Kit* mutation) and children (panel D, expressing Del419Asp *c-Kit* mutation). On these panels, the percentage of double positive c-Kit and hTERT cells were respectively 80% for adults and 45% for the child.

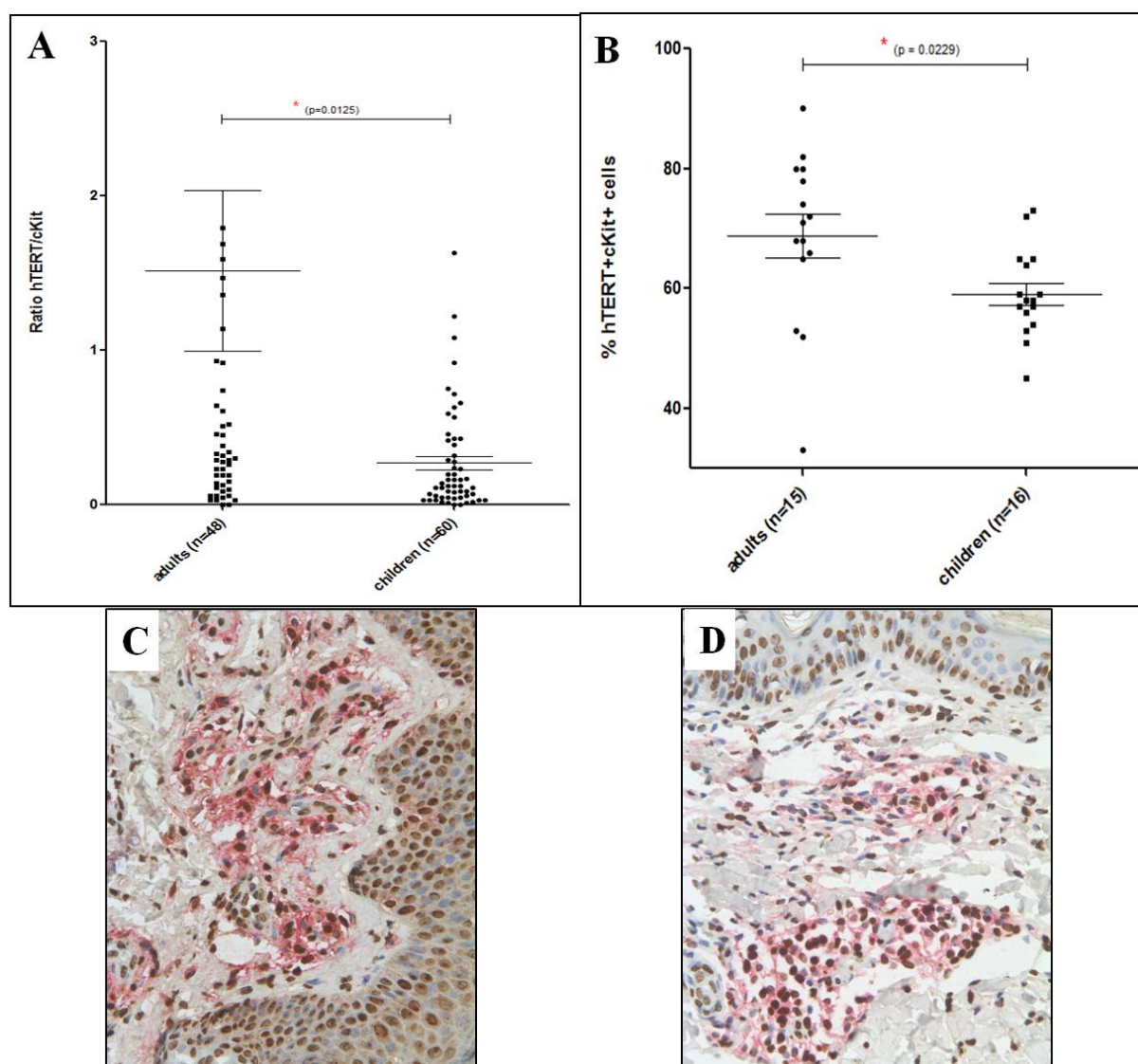


Figure 2. Telomerase activity of mature mast cells in the bone marrow of mastocytosis patients.

Mature primary mast cells do not have telomerase activity. Medullar hematopoietic precursors physiologically hold positive telomerase activity. Here we show that medullar mast cell of patient with mastocytosis have telomerase activity even if it is lower than the telomerase activity observed in their hematopoietic precursors or those of healthy controls.

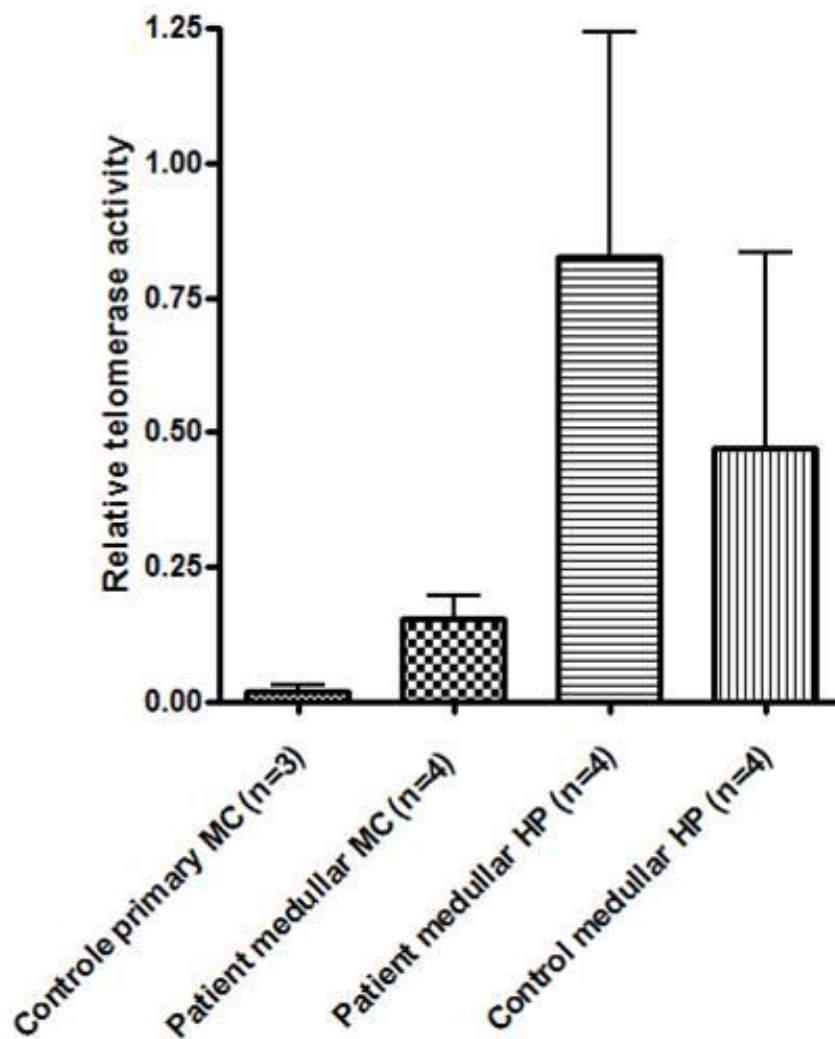


Figure 3. Cellular senescence.

Results are expressed as the percentage of SA- β -galactosidase (Gal)-positive cells. Mouse bone marrow mast cells (BMMC) cultivated with SCF (A) or IL3 (B). BMMC were infected with D816V (C) or Del 419Asp (D) *c-Kit* mutant. Manipulations were done in triplicate and results are expressed with median \pm SD. The percentage of positive cells was calculated after counting 200 cells.

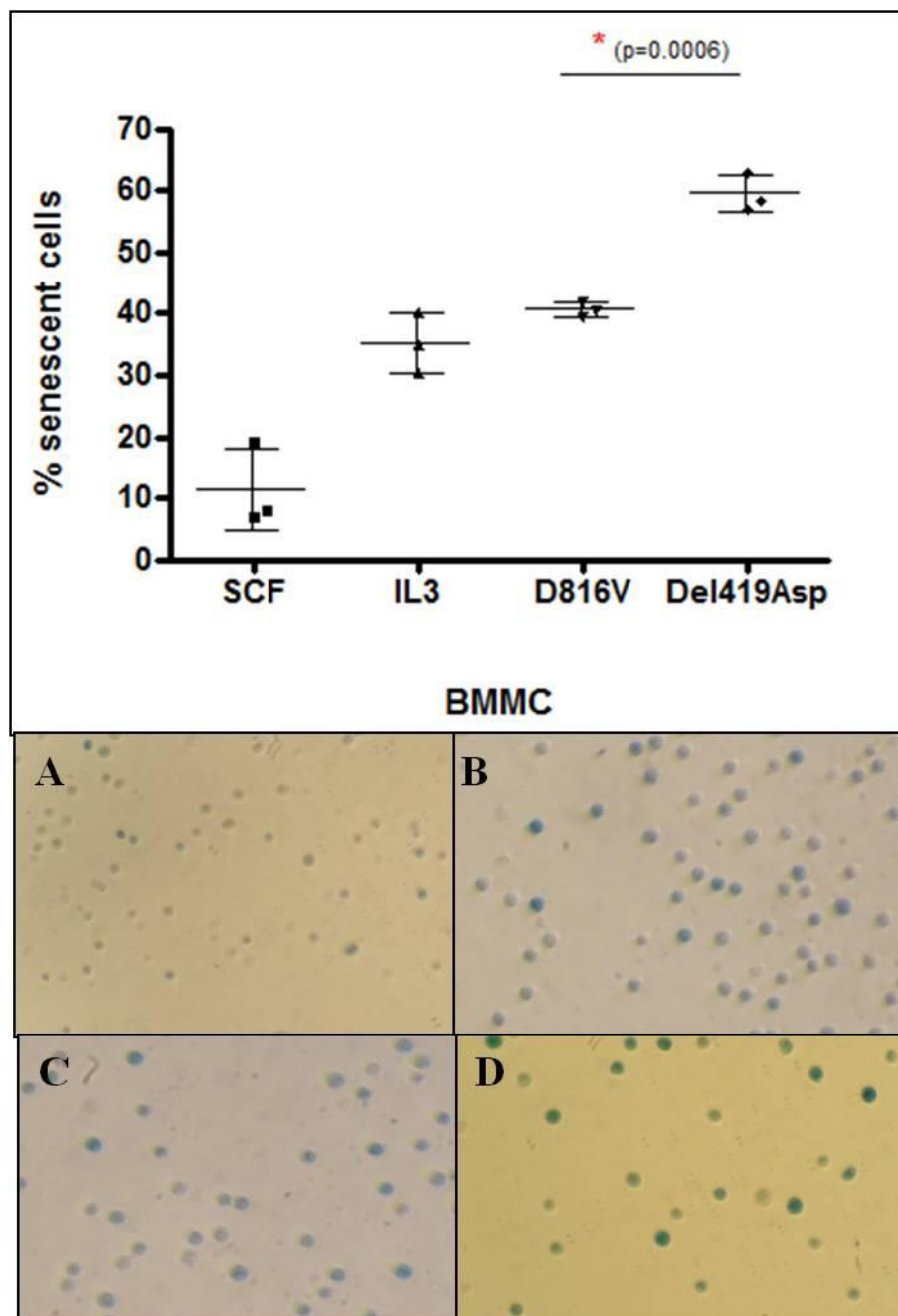


Figure 4. FISH analysis of BMMC transfected with various c-Kit mutations.

(A) Telomeric FISH of BMMC untransfected or transfected with ECD or PTD c-Kit mutants. (B) Quantitative FISH analysis of telomeric signals obtained from BMMC transduced with either an empty vector, or ECD or PTD c-Kit mutants. Individual and mean values are presented.

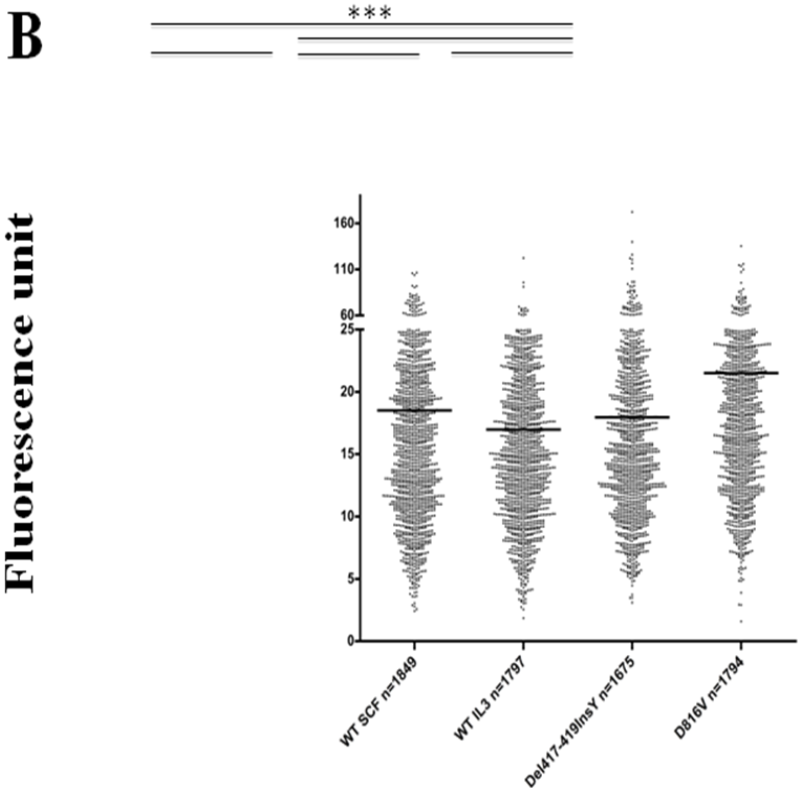
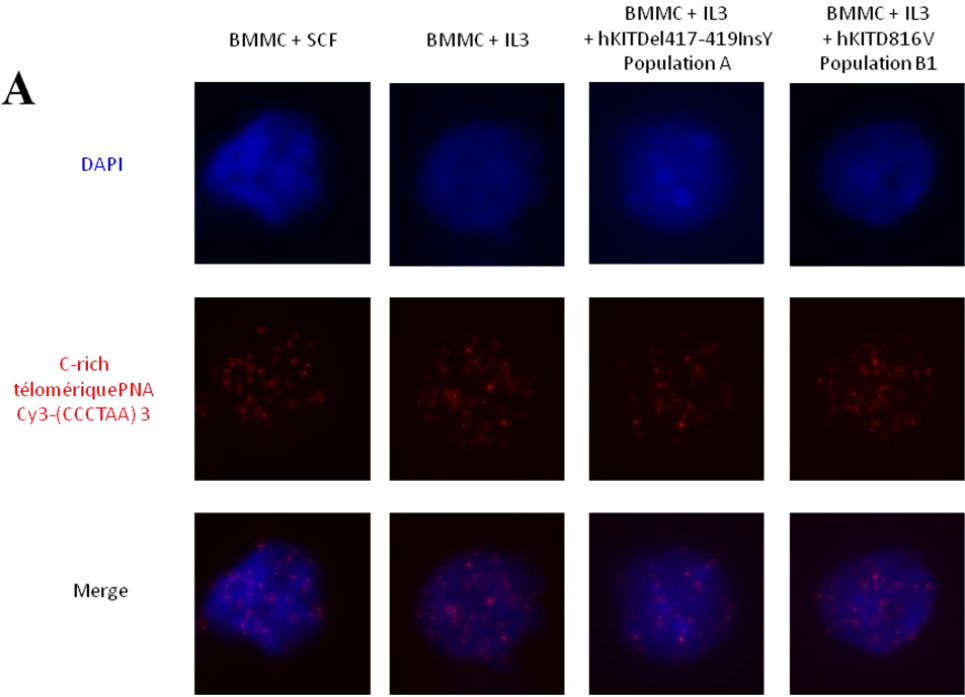


Figure 5. Patient, Mr L, with mast cell sarcoma and, *c-Kit* Val560Gly mutation; hTERT expression was negative on immunohistochemistry; but an ALT mechanism was researched.

A: Abdominal CT scan showing voluminous a splenomegaly and ascites. **B-E:** Histological examination of biopsies X40; **B:** muscular biopsy, HES coloration; **C-E:** Bone marrow biopsy: **C:** positive CD30 immunostaining; **D** positive tryptase staining; **E** positive C-Kit immunostaining.**F:** sequence of *c-Kit* gene showing a c.1679T>G p.Val560Gly mutation, but no mutation in exon 17.**G-H:** Flow cytometry analysis of a bone marrow aspiration (**G**) and spleen (**H**) a population of *c-Kit*/ CD117⁺ CD34⁻CD45^{low}CD2^{low}CD25⁻ mast cells. On the spleen, a staining for Ki67and CD52 was performed and was positive.

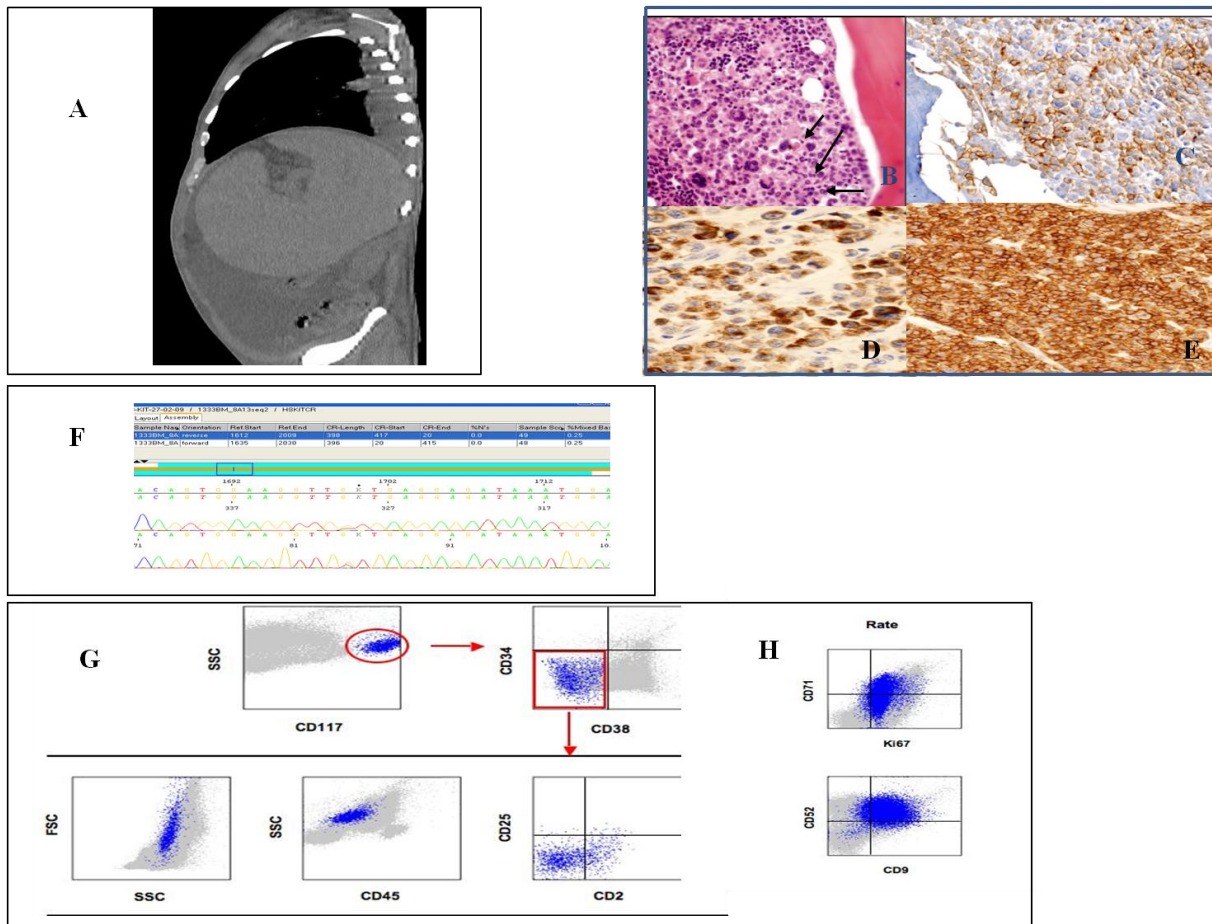


Figure 6. Presence of an ALT mechanism only in mast cells of a patient with mast cell sarcoma (Mr L) and mutation in exon 10 of *c-Kit* (panel A).

Individual telomeres as detected by anti-TRF2 antibody (green) may appear associated with the surface of naturally large APBs, revealed here by anti-PML antibodies (red). The presence of an ALT mechanism is observed when TRF2 merge with PML. On panel A, a phenomenon of ALT is detected whereas on the other panels, no evidence of ALT was observed: panel B: mast cells of an aggressive patient with D816H *c-Kit* mutation. Panel C: control leukemia cells of a patient with acute HTLV I leukemia. Panel D: healthy control's PBMC. FISH using a telomere probe (green) was performed in combination with fluorescence immunolabelling for PML (red dots). Colocalization of the telomeric DNA (TRF2) and PML, confirms the presence of an ALT mechanism in the mast cells of the patient with the pediatric Val 560 Gly *c-Kit* mutation and the sarcoma tumor.

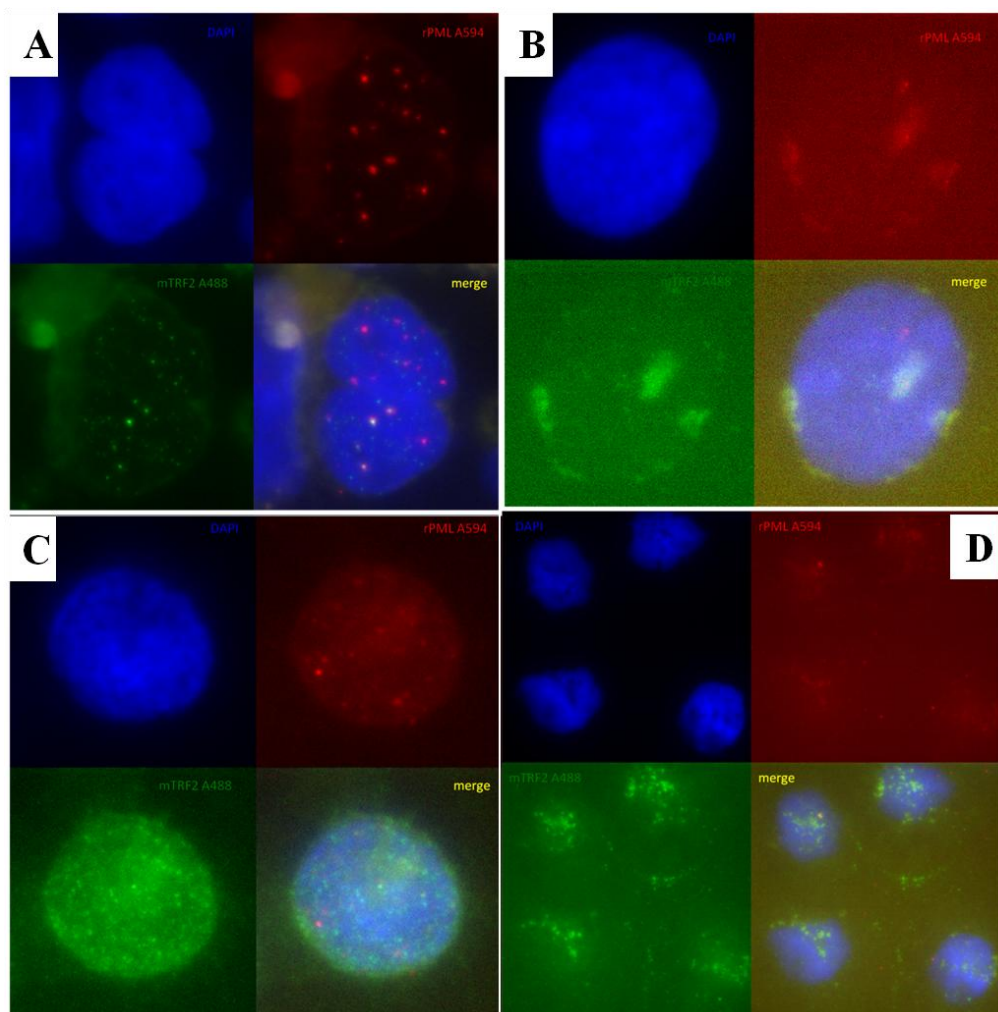


Figure 7. Main features of Mr B, a patient with mast cell sarcoma.

This patient presented no *c-Kit* and no hTERT expression by Q TRAP as well as immunohistochemistry. Panel **A and B**: CT scan showing tumorous lesions. **A**: tumour and bone lysis on right ilium; **B** lesions above left clavicle with costal bone lysis. Panels **C-F**: Histological examination of cutaneous biopsy: **C-D**: HES coloration; **C**: dermal mast cell infiltration X25; **D**: big irregular mast cells X 40. **E**: c-Kit immunostaining showing high positivity of infiltrative mast cells X 25; **F**: CD25 immunostaining showing positivity of abnormal mast cells X40. Panels **G-J**: Histological examination of a biopsy of the left axillar mass X40. **G**: HES coloration showing infiltrative mast cells; **H**: positive Ki67 immunostaining; **I**: positive CD25 immunostaining ; **J** positive c-Kit immunostaining . **K**: sequence of *c-Kit* gene showing no mutation, especially in exon 17. **L**: Flow cytometry analysis of a bone marrow aspiration showing a population of c-Kit/ CD117⁺ CD34⁺ CD45^{low}CD2⁺CD25⁺ mast cells

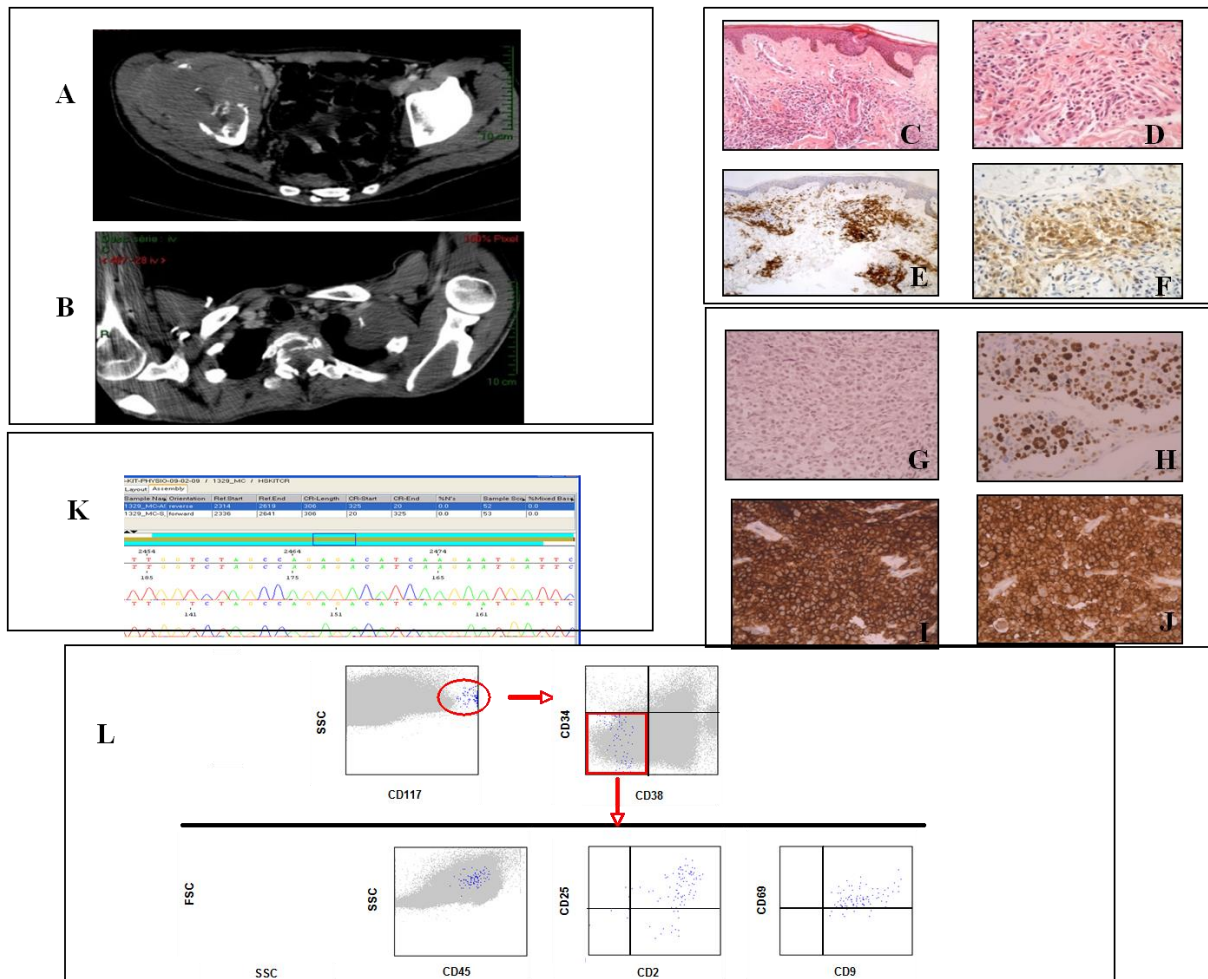


Figure 8. CGH array of patient B with mast cell sarcoma.

CGH array profile of patient B showing bone marrow cells (A) and mast cell sarcoma (B) and peripheral blood mononuclear cells or bone marrow cells from two patients with indolent mastocytosis (C, D). Only in the mast cell sarcoma major chromosomal abnormalities can be seen such as deletions and additions.

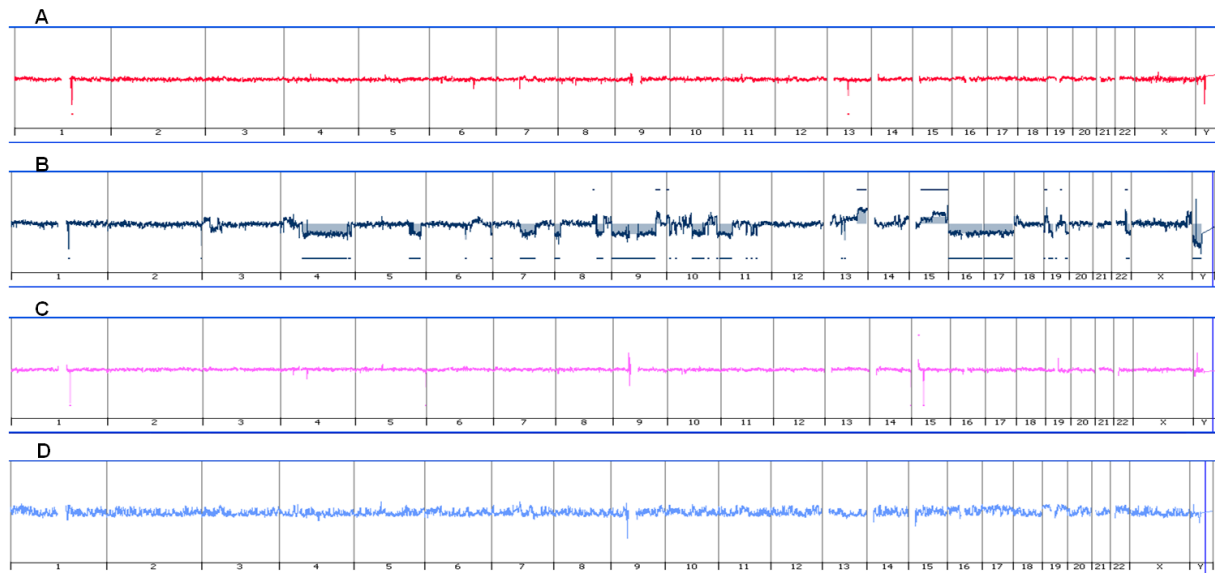
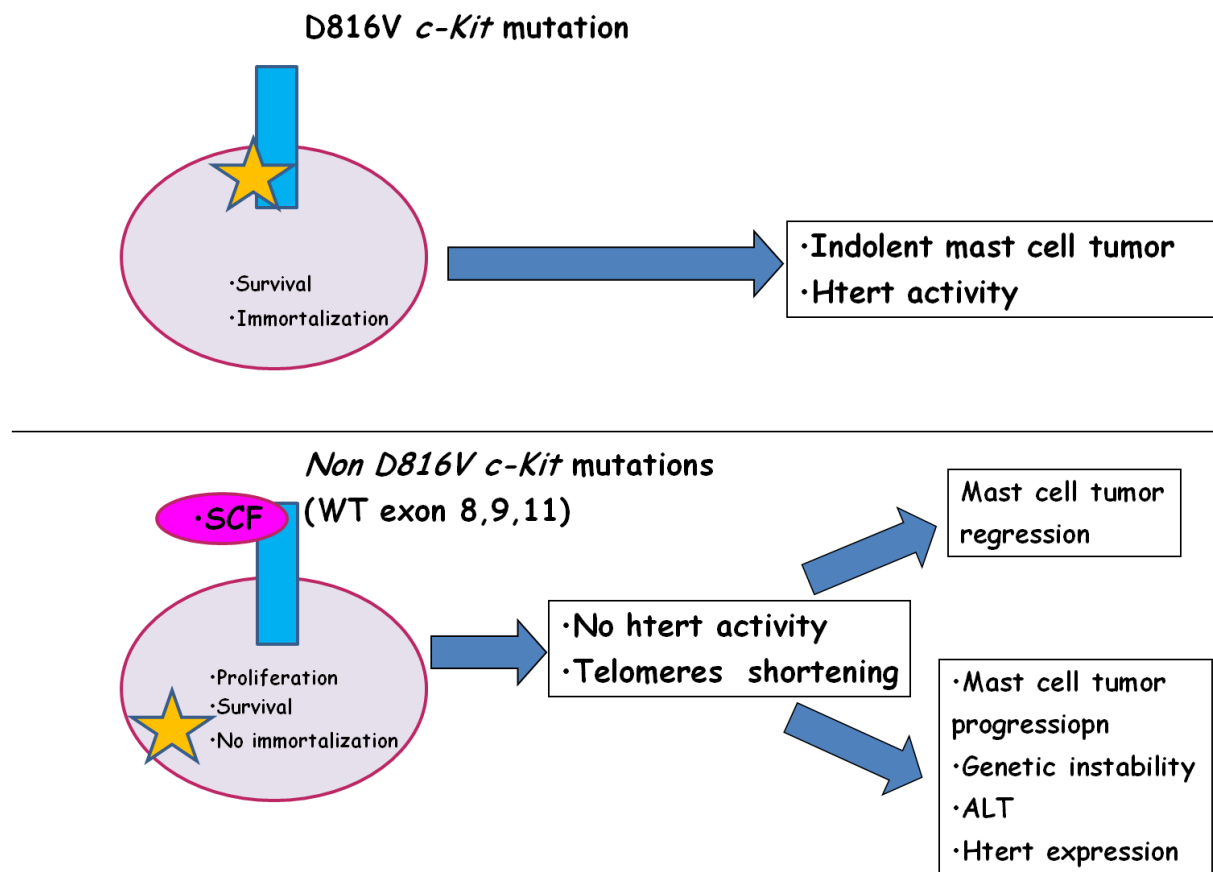


Figure 9. Physiopathological hypothesis.

Considering the two clinical evolutions of mastocytosis: adult forms which do not regress and pediatric form which spontaneously regress, our result could be summarized as follows: mast cells with the *c-Kit* D816V mutation survive for a long time thru hTERT activity and are associated with an indolent form of mastocytosis and in a few cases in immortalization and mast cell tumor. In pediatric cases, mast cells bearing no D816V *c-Kit* mutation undergo proliferative senescence and shorten their telomere. This phenomenon leads in most cases to the apoptosis of tumoral mast cells, without expression of hTERT, thus inducing mast cell tumor regression; but in rare cases, shortened telomere induce genetic instability, which is able to induce chromosomal abnormalities leading to very aggressive mast cell tumor (like sarcoma). In other cases, without D816V *c-Kit* mutations, telomere can be lengthened by an alternative telomere lengthening (ALT) as seen among one case of mast cell sarcoma.



2. Travail sur les troubles psychiques et le métabolisme des télomères au cours de la mastocytose.

Telomere shortening in mastocytosis is associated with depression, stress, anxiety and emotion regulation deficits.

S. Georgin-Lavialle*, D. Silva Moura*, A-S. Gabet, A-L Gacon, C. Grandpeix-Guyodo, G. Damaj, J-M. Launay, I. Durieu, A. Esparcieux, I. Guichard, A. Sparsa, F. Nicolini, F. Navaux, M-O. Chandesris, S. Barete, O. Lortholary, P. Dubreuil, S. Sultan, O. Hermine.

*copremiers auteurs

En revision au Journal of Allergy and Clinical Immunology

Introduction : L'érosion télomérique est associée au vieillissement cellulaire, qui lui-même est accru en cas de stress psychologique. Mastocytose et vieillissement cellulaire sont tous deux associés à la présence d'émotions négatives. Comme les mastocytes semblent être impliqués dans les réactions émotionnelles, nous avons émis l'hypothèse que la mastocytose pourrait constituer un modèle pour étudier les relations entre les processus impliqués dans le raccourcissement des télomères et la production d'émotions négatives comme le stress, la dépression, l'anxiété et des déficits de régulation émotionnelle.

Objectif : Etudier le système télomère/téломérase chez des adultes atteints de mastocytose afin de vérifier si l'association entre l'émotivité et la longueur des télomères est plus forte dans cette pathologie que dans une population stressée mais indemne de mastocytose.

Méthodologie : L'activité télomérasique et la longueur des télomères dans les PBMC de 19 patients avec mastocytose ont été mesurés, respectivement par Q TRAP et southern blot. Ces résultats ont été corrélés pour chaque patient à leurs émotions négatives (stress perçu, anxiété, dépression) et à leurs déficits de régulation émotionnelle (alexithymie et suppression des émotions).

Résultats : Les émotions négatives sont significativement corrélées à la longueur des télomères. L'interaction entre le raccourcissement télomérique et le stress perçu est significativement plus forte dans la mastocytose que dans une population sans maladie médiée par les mastocytes. Les déficits de régulation émotionnelle sont fortement prédictifs de raccourcissement des télomères indépendamment des émotions négatives.

Conclusion/ Perspectives : Les mastocytes semblent participer à l'émotivité. L'implication des mastocytes dans les relations entre le fonctionnement émotionnel et la longueur des télomères est une piste intéressante pour de nouvelles études. Par ailleurs, les mastocytes pourraient constituer une cible potentielle dans la prévention du vieillissement cellulaire.

Manuscript Number:

Title: Telomere shortening in mastocytosis is associated with depression, stress, anxiety and emotion regulation deficits

Article Type: Original Article

Section/Category: Original Article - Other

Keywords: Mastocytosis; mast cell; telomere length; cellular aging; negative emotionality; emotion regulation deficits; psychological stress.

Corresponding Author: Professor Olivier Hermine, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: APHP and CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Paris

First Author: Sophie Georgin-Lavialle, MD

Order of Authors: Sophie Georgin-Lavialle, MD; Daniella SILVA MOURA; Anne-Sophie GABET, PhD; Anne-Laure GACON; Catherine Grandpeix-Guyodo, MD; Gandhi Damaj, MD; Jean-Marie LAUNAY, PharmD, PhD; Isabelle Durieu, MD; Aurélie Esparcieux, MD; Isabelle Guichard, MD; Agnès Sparsa, MD; Franck E Nicolini, MD, PhD; Frédérique Navaux, MD; Marie-Olivia Chandesris, MD; Stéphane Barete, MD; Olivier Lortholary, MD, PhD; Patrice Dubreuil, PhD; Serge SULTAN, PhD; Olivier HERMINE, MD, PhD

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Abstract: Background: Mastocytosis is a rare disease, which in most cases does not reduce life expectancy, but is associated to mast cell release symptoms leading to disability. Cellular aging has been related to negative emotionality and is associated to telomere shortening. As mast cells might be involved in emotionality, we chose mastocytosis as a model to study the relationship between telomere shortening and generation of negative emotionality.

Objective: Investigate if mastocytosis is associated with emotionality and change in telomerase length. **Methods:** telomere length and telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of nineteen patients with mastocytosis were measured, by Q TRAP and southern blot, and correlated to their negative emotionality (perceived stress, anxiety, depression) and emotion regulation deficits (alexithymia and emotion suppression).

Results: Negative emotionality correlated negatively to telomere length ($r = -0.493$ to -0.761 ; $p = 0.032$ - 0.0001). Interaction between telomere length and perceived stress was stronger in mastocytosis than in a population without mast cells-mediated disease ($z = 2.308$, $p = .010$). Telomere shortening was strongly predicted by emotion regulation deficits ($\beta = -0.668$ to -0.704 ; $p = 0.001$) independently of negative emotionality.

Conclusion Mastocytosis represents a paradigm of mast cell-mediated disease. We propose three hypotheses to explain why mast cell may represent the link between brain and periphery and induce telomere shortening: firstly, negative emotionality could influence mast cell activity which directly influences telomere length; secondly, mast cell could influence emotion regulation capacities leading to consequent negative emotionality and/or telomere shortening; thirdly, mast cell and emotion regulation deficits could directly influence telomere shortening, independently of emotionality.

Title

Telomere shortening in mastocytosis is associated with depression, stress, anxiety and emotion regulation deficits

Authors :

Sophie Georgin-Lavialle, MD^{1,2,3*}, Daniela Silva Moura^{2,4*}, Anne-Sophie Gabet, PhD³, Anne-Laure Gacon³, Catherine Grandpeix-Guyodo, MD², Gandhi Damaj, MD⁵, Jean-Marie Launay, PharmD, PhD⁶, Isabelle Durieu, MD⁷, Aurélie Esparcieux, MD⁷, Isabelle Guichard, MD⁸, Agnès Sparsa, MD⁹, Franck Nicolini, MD, PhD¹⁰, Frédérique Navaux, MD¹¹, Marie-Olivia Chandesris, MD^{1,2}, Stéphane Barete, MD², Olivier Lortholary, MD, PhD^{2,12}, Patrice Dubreuil, PhD^{2,13}, Serge Sultan, PhD⁴, Olivier Hermine, MD, PhD^{1,2,3}.

Affiliations:

¹ Service d'Hématologie Adultes et ²centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Necker-Enfants malades ; Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

³CNRS UMR 8147, Hôpital Necker-Enfants malades ; Université Paris Descartes, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

⁴Laboratoire de Psychopathologie et Processus de Santé, EA 4057, Institut de Psychologie, Université Paris Descartes

⁵ Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens, France.

⁶Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, INSERM U942, RTRS Santé Mentale

⁷ Service de médecine interne, CH Lyon Sud, Chemin du Grand Revoyet - 69495 Pierre Bénite, France.

⁸ Service de médecine interne, Hôpital Nord, 42055 Saint-Etienne Cedex 2, France.

⁹ Service de dermatologie, Hôpital Dupuytren, 2, avenue Martin Luther King 87042 Limoges cedex, France.

¹⁰ Service d'hématologie, Hôpital Edouard *Herriot* 5 Place d'Arsonval 69437 *Lyon, France*.

¹¹ Service de rhumatologie, CH Perpignan, 20 Avenue du Languedoc - BP 4052 66046 Perpignan, France.

¹²Service des infectieuses et tropicales, et centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris V.

¹³INSERM UMR 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Laboratoire d'Hématopoïèse Moléculaire et Fonctionnelle, Marseille, France.

* The first two authors contributed equally to this work

Corresponding author: Pr. Olivier Hermine

Service d'Hématologie Adultes, CNRS UMR 8147 et centre de référence sur les mastocytoses,

Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris Descartes

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

E-mail: ohermine@gmail.com

Word counts: abstract: 249; text: 2991

Sources of Fundings

S. G-L is a recipient from a grant from the Société Nationale Française de Médecine Interne (bourse SNFMI-Genzyme maladies rares) and is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

D. SM is recipient from a grant from Cancéropôle Ile-de-France (Appel d'offre SHS 2009).

Abstract

Background: Mastocytosis is a rare disease, which in most cases does not reduce life expectancy, but is associated to mast cell release symptoms leading to disability. Cellular aging has been related to negative emotionality and is associated to telomere shortening. As mast cells might be involved in emotionality, we chose mastocytosis as a model to study the relationship between telomere shortening and generation of negative emotionality.

Objective: Investigate if mastocytosis is associated with emotionality and change in telomerase length.

Methods: telomere length and telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of nineteen patients with mastocytosis were measured, by Q TRAP and southern blot, and correlated to their negative emotionality (perceived stress, anxiety, depression) and emotion regulation deficits (alexithymia and emotion suppression).

Results: Negative emotionality correlated negatively to telomere length ($r=-0.493$ to -0.761 ; $p=0.032-0.0001$). Interaction between telomere length and perceived stress was stronger in mastocytosis than in a population without mast cells-mediated disease ($z = 2.308$, $p = .010$). Telomere shortening was strongly predicted by emotion regulation deficits ($\beta=-0.668$ to -0.704 ; $p=0.001$) independently of negative emotionality.

Conclusion Mastocytosis represents a paradigm of mast cell-mediated disease. We propose three hypothesizes to explain why mast cell may represent the link between brain and periphery and induce telomere shortening: firstly, negative emotionality could influence mast cell activity which directly influences telomere length; secondly, mast cell could influence emotion regulation capacities leading to consequent negative emotionality and/or telomere shortening; thirdly, mast cell and emotion regulation deficits could directly influence telomere shortening, independently of emotionality.

Key messages:

Patients with mastocytosis present a high frequency of negative emotionality which correlates to telomere shortening.

Mast cells might be involved in the pathway linking psychological stress to cellular aging.

Capsule summary:

In a mast cell mediated disease, deficits in emotion regulation and negative emotionality strongly correlated to cellular aging. This could sign a particular role of mast cells between emotionality and telomere length.

Key words:

Mastocytosis; mast cell; telomere length; cellular aging; negative emotionality; emotion regulation deficits; psychological stress.

Abbreviations

ASM: Agressive systemic mastocytosis

BDI-II: Beck Depression Inventory

CM: Cutaneous mastocytosis

ERD: Emotion regulation deficits

ERQ: Emotion Regulation Questionnaire

ISM: Indolent systemic mastocytosis

M: Mean

MC: Mast cells

MS: Mastocytosis

NE: Negative emotionality

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate-buffered saline

PSS A/B: Perceived Stress Scale

SA: State Anxiety

SD: Sstandard deviation

SM: Systemic mastocytosis

SM-AHNMD: Systemic mastocytosis associated to non mast cell disease hemopathy

STAI-Y: State-Trait Anxiety Inventory

TA: Trait Anxiety

TL: Telomere length

TAS: Toronto Alexithymia Scale

TRF: Telomere restriction fragment

TS: Telomere shortening

WT: Wild type

Introduction

Telomeres are specialized nucleoproteic structures that cap and protect the ends of chromosomes. They can be elongated by the telomerase enzyme, but in telomerase negative cells, telomeres shorten after each cellular division¹. This phenomenon leads ultimately to cellular senescence, conferring to the telomeres a role of biological clock^{2,3}. Epel *et al* found that chronic perceived stress was correlated to shortened leukocyte telomere length, a phenomenon attributed at least in part to higher levels of oxidative stress at the cellular level⁴. In addition, telomere shortening has also been associated to pessimism, schizophrenia and mood disorders⁵⁻⁷. These findings suggest a link between negative emotionality and cellular aging through telomerase activity reduction, but the underlying mechanisms explaining this down regulation is still undetermined.

Mastocytosis is a rare and heterogeneous disease characterized by mast cells (MC) accumulation in one or several organs⁸⁻¹¹. The disease is broadly divided into localized versus systemic forms. Systemic mastocytosis (SM) is subsequently divided into indolent and aggressive disease based on organ injuries¹⁰⁻¹². Adults with SM usually present *c-kit* gene mutations, most frequently D816V leading to MC abnormal accumulation and activation. Life expectancy in mastocytosis is not significantly different from that of the age- and sex-matched US population¹³. However, 70% of mastocytosis patients suffer from a disability¹⁴. In mastocytosis, we and others have shown that patients present psychological manifestations including memory impairment and psychological distress (depression, irritability and anxiety)^{14, 15}. Negative emotionality observed in mastocytosis has not been evaluated and it is not known whether or not it is related to the severity of the illness. We have previously shown that self reported depression in patients was unrelated to the illness severity, suggesting that MC over reactivity may interfere with brain functions¹⁴. In agreement with this hypothesis, anxiety is frequent in pathologies in which over activation of mast cells is suspected such as asthma, food allergies and irritable bowel syndrome^{16, 17}. In addition, experimental *in vivo* models have also established a link between anxiety-like behavior in rodents and mastocytes during allergic reactions induced in animal models¹⁸. MCs are present in brain particularly in regions known for their involvement in the regulation of emotions such as hypothalamus and amygdalae^{19, 20}, and at the proximity of nerves and likewise recent researches suggest that they are involved in emotionality²¹⁻²⁴. Taken together, these data suggest that mast cell might be involved in underlying neuroimmunological mechanisms leading from negative emotionality to telomere shortening and cellular aging.

In order to test this hypothesis we have investigated and quantified negative emotionality in MS and correlated it to telomere length and compare these correlations with the one previously reported in chronic perceived stress populations without known MC deregulation diseases.

Methods

Patients (Table 1)

Nineteen consecutive adults with a mastocytosis diagnosis as defined by the international consensus criteria^{10, 11} and 17 age-matched healthy controls without psychiatric history were enrolled in a prospective national multicentric French study between 2007 and 2010. All patients provided informed consent. The study was approved by the ethical committee of Necker hospital, and was carried out in compliance with the precepts of the Helsinki protocol. Clinical forms of mastocytosis included cutaneous (n=3), indolent (n=10) and aggressive mastocytosis (n=6). Cutaneous mastocytosis was defined by the presence of pathological mast cells in the skin but their absence on bone marrow biopsy. For each patient from our cohort, we had access to his complete medical file, serum tryptase levels and results of *c-kit* gene sequencing in skin, blood and/or bone marrow when available. We measured telomere length and telomerase activity of the PBMC's (Peripheral Blood Mononuclear Cells) of each patient. The study population consisted of 8 men and 11 women. Median age was 46 years, ranging from 21 to 77. The *c-kit* D816V mutation was detected among 14 patients, whereas 5 patients were *c-kit* WT (wild type). The median serum tryptase level was 63µg/L ranging from 1.3 to 250 µg/L. Telomere length and telomerase activity measurements in PBMC as well as psychological assessment were performed for all patients.

Methods

PBMC isolation

Peripheral blood was obtained by venipuncture in heparinized tubes. PBMCs were isolated by the standard Ficoll-IPaque method (Amersham Life Science, U.K). Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% foetal bovine serum (FBS). DNA extraction was performed on 5.10^6 cells for telomere length analysis, while 2.10^5 cells were used for telomerase activity measurement.

Telomerase activity measurement

2.10^5 PBMCs were lysed and QTRAP assay was performed on the protein extract as described by the Allied Biotech® Quantitative Telomerase Detection kit. The measure was done in triplicate and the mean was calculated. For each sample, the result was expressed in relative telomerase activity, after comparison with the result found for the positive control provided by the manufacturer.

Telomere length measurement

Genomic DNA was extracted from PBMC using the Easy DNAkit from Invitrogen®. Telomere length was then measured using TeloTAGGG Telomere length assay kits (Roche

Molecular Biochemicals, Basel Switzerland). Briefly, 2 µg of DNA (sample or control DNA) was digested with 40 U HinfI and 40 U RsaI (Roche) at 37 °C overnight. Separation of digested DNA was done by 1% agarose gel electrophoresis at 30V in 0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0 buffer for 18H. After electrophoresis, the DNA fragments were transferred by Southern blotting (by capillary transfer) to a positively charged nylon membrane (Hybond N+, Amersham, Little Chalfont, UK) at room temperature using 3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0. The transferred DNA was then fixed on the blotting membrane by UV-crosslinking (UV Stratalinker 1800; Stratagene, La Jolla, CA, USA). The blotted DNA fragments were hybridized to a digoxigenin-labelled probe specific for telomeric repeats in hybridization oven (Techne, Burlington, NJ, USA) at 42 °C for 3h. The membrane was incubated with a digoxigenin-specific antibody covalently coupled to alkaline phosphatase and then visualized by virtue of alkaline phosphatase metabolizing CDP-Star, a highly sensitive chemiluminescence substrate. The membrane was exposed to a Hyperfilm ECL (Amersham) and the films were analyzed using Adobe PhotoShop and Science Lab 99 Image Gauge software (Fuji Photo Film Co., Ltd, Stamford, CT, USA). The mean size of the telomere restriction fragment (TRF) was estimated using the Telometric® software. The DNA of each patient was compared to the DNA of an age matched healthy control. Thus the patient's telomere length result is expressed as a relative telomere length (in %) in comparison with the telomere length of an age-matched healthy control.

C-kit gene sequencing and Measurement of serum tryptase

This technique has been previously described^{25, 26}. The level of total tryptase (protryptase + βtryptase) in serum samples was determined using a fluorescence enzyme-linked immunoassay (Unicap; Pharmacia)²⁷. The detection limit of this assay is 1 ng/mL, and in healthy controls, serum tryptase levels range between less than 1 and 15 ng/mL, with a median about 5 ng/mL²⁸.

Psychological evaluation

Psychological widespread assessment included measures of negative emotionality: scores of depression, trait and state anxiety and perceived stress. Depression was assessed by the Beck Depression Inventory (BDI-II)²⁹. Trait and state anxiety were assessed with the State-Trait Anxiety Inventory (STAI-Y A/B)³⁰. Anxiety can be considered as a short term state or a long term predisposition. Trait anxiety reflects a stable propensity to respond with anxiety in situations evaluated as intimidating by the individual. Stress was assessed by the Perceived Stress Scale (PSS)³¹. Psychological stress results from a particular transaction between the individual and the environment³². The perception of stress relates to the subjective judgment of the personal importance of events. The PSS measures the degree to which life events are appraised as stressful by individuals. Measures of emotion regulation aptitudes included measures of alexithymia and emotion suppression and reappraisal. An emotion regulation strategy refers to the method employed to influence the time in which emotions occurs, as well as the experience and expression of emotions³³. Alexithymia is a particular state of deficiency in understanding (distinguishing feelings from bodily sensations of emotional

arousal), processing (identifying) and expressing emotions. It was assessed by the 20 item Toronto Alexithymia Scale (TAS-20)³⁴. Emotion regulation strategies (reappraisal/suppression) were assessed by the Emotion Regulation Questionnaire (ERQ)³⁵. Reappraisal is an early cognitive strategy of intervention which influences both the experience and the subsequent expression of emotion (attempts to revise the way one think about a situation to alter its emotional impact). Suppression refers to a later strategy which focuses on alteration of the expressional component of emotion, rather than physiological and experiential components (attempts to ignore the emotion and avoid its expression)³⁵. Suppression strategies may have negative effects on the physiological and the experiential components of emotion as one applying this strategy is able to effectively hide their emotional experience, but remain experiencing this emotion at the subjective and physiological levels.

Statistical analysis

Statistical comparisons between characteristics of healthy donors and patients with different types of mastocytosis (CM, ISM, ASM, SM-AHNMD) were based on unpaired t test. Data were analyzed using GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical analysis of the relations between psychological data and telomere length were based on correlation tests, linear regression and non-parametric Mann-Whitney test. Data were analyzed using PAWS software version 17.0 (IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, USA). All reported p values are two tailed with a significance level of .05. Outliers with residuals equal or higher than a 1.5 standard deviation (SD) were excluded from regression analyses.

Results

Patients with mastocytosis present high prevalence of anxiety, depression, perceived stress and alexithymia.

Using published cut-off values, we found that in our sample, 100% of patients were anxious (state anxiety) (mean (M) =57; standard error (SE)=11.18), 38% were depressed (M=14; SE= 8.26), and 47% were alexithymic (M=52; SE= 15.69). Trait anxiety characterized 95% of patients (M=51; SE= 10.67) and 95% perceived high levels of stress (M=36; SE= 10.30 (scores \geq 30)). Mean score of emotion suppression subscale of ERQ was 10.52 (SE=5.22) and 21.63 (SE=8.37) for the reappraisal subscale. Ccorrelations were found between psychological measures. Depression was related to trait anxiety ($r = .729$; $p < .001$), state anxiety ($r = .542$; $p = .016$) and perceived stress ($r = .624$; $p = .004$). Trait anxiety was related to stress ($r = .570$; $p = .011$) and to state anxiety ($r = .754$; $p < .001$). Alexithymia was related to emotion suppression ($r = .605$; $p = .006$). In addition, emotion suppression was related to trait anxiety ($r = .630$; $p = .004$), and depression ($r = .498$; $p = .030$). Interestingly, alexithymia and emotion reappraisal were not related to any of the negative emotionality variables.

Telomerase activity and telomere length measurements

Low telomerase activity was observed in the PBMC of all patients with mastocytosis. The relative telomere length of patients was compared to the disease duration. There was no correlation between relative telomere length and the total time with the disease.

Negative emotionality is strongly related to telomere shortening in mastocytosis patients

Telomere length was related to all measures of negative emotionality and deficits in emotion regulation. Figure 1 shows correlations between telomere erosion and perceived stress ($r = -.761$; $p < .0001$), trait anxiety ($r = -.561$; $p = .019$), state anxiety ($r = -.533$; $p = .028$), depression ($r = -.493$; $p = .032$). Telomere length was also correlated to alexithymia ($r = -.704$; $p = .001$) and emotion suppression ($r = -.668$, $p = .002$) but not with emotion reappraisal (Fig.2). In addition, to evaluate the magnitude of the associations between negative emotionality and telomere shortening in mastocytosis, we used Fisher's transformation to compare our correlations to those from a population without a MC-mediated disease. We tested differences in correlations concerning telomere length and perceived stress from mastocytosis to those found in mothers with chronic perceived stress aged 38 +/- 6.5 years in Epel et al.'s report⁴ and found a significant difference ($z = 2.308$, $p = .010$).

Telomere length was strongly predicted by emotion regulation deficits independently of the presence of negative emotionality

The best psychological predictor of telomere length as determined by a forward stepwise multiple regression analysis was Alexithymia ($\text{B}\hat{\text{e}}\text{t}\hat{\text{a}} (\beta) = -.704$; $\text{SE} = .173$; $p = .001$) followed by emotion suppression ($\beta = -.668$; $\text{SE} = .545$; $p = .002$). When controlling for all psychological distress measures (depression, anxiety and perceived stress), the association between alexithymia and telomere length remained highly significant and strong ($\beta = -0.608$, $p = 0.009$, $\Delta R^2 = 0.440$). The same was observed with emotion suppression ($\beta = -0.645$, $p = 0.024$, $\Delta R^2 = 0.357$).

Alexithymia, emotion suppression and telomere length are not correlated to tryptase levels

In order to explain this large relationship between alexithymia, emotion suppression and telomere length, we tested if tryptase could influence this relation. We used procedure to test mediation power in regression analyses following the procedure detailed in Baron & Kenny³⁶. We did not demonstrate mediation. Tryptase level did not correlate to telomere length and the correlation was not significant with alexithymia.

Discussion

In the present study, we found in patients with mastocytosis, a high frequency of negative emotionality that correlated to telomere shortening particularly for patients with deficits in emotion regulation as alexithymia and emotion suppression strategies independently of

negative emotionality. These correlations were stronger than in populations without MC-mediated disease, suggesting that mast cells might be the missing link between the brain and telomere shortening.

In this population increased telomeric erosion was not compensated by a reactivation of the telomerase activity. This suggests either a phenomenon of accelerated cell aging without subsequent elevation of telomerase activity to stabilize or increase telomere length, or this could reflect an increased proliferative senescence of PBMC. A reduced PBMC lifespan may be consecutive to increased oxidative cellular stress in response to psychological distress. To explain this phenomenon it has been hypothesized that, psychological stress could induce oxidative cellular stress, which could lead to telomere shortening and reduced cellular lifespan, if the telomerase is not reactivated. In this regard, it is interesting to note that mast cells may produce reactive oxidative species upon various stimuli independently of IgE stimulation and it is tempting to speculate that neurological stimuli could be one of them³⁷⁻³⁹.

All patients presented important levels of negative emotions displaying high scores of state and trait anxiety as well as by perceived stress, alexithymia and depression. Consistent with other studies, negative emotionality (depression, perceived stress and anxiety) was correlated to shortened telomere length^{4, 6, 40, 41}. Here we show for the first time these relations in a population with a MC-mediated disease. Interestingly, despite our small cohort of patients, effect sizes from the relation between perceived stress and telomere length were larger in mastocytosis than in the previous study focusing in a population without a MC-mediated disease⁴. Therefore as we have hypothesized our data suggest that MC could be involved in this process. Three hypothesis could be raised: 1) Negative emotionality influences MC activity, which directly impacts on telomere length (top down hypothesis); 2) MC influence emotion regulation capacities, which lead to consequent negative emotionality and/or telomere shortening (bottom up hypothesis); 3) Mast cell and emotion regulation deficits influences telomere shortening directly and independently of emotionality (synergic independent ways hypothesis) (Fig.3)

Independently of the presence or not of negative emotionality, deficits in emotion regulatory processes consisting in emotion suppression strategies and alexithymia appeared strongly predictive of telomere shortening in a rare MC mediated disease characterized by spontaneous activation of mast cells. Figure 4 illustrate how deficits in emotion regulation could lead to cellular aging independently of negative emotionality or through their generation. This result suggests a particular role of emotion regulation processes and cellular aging in mastocytosis. We could not prove if this relation was MC mediated but we showed that the best predictive model of telomere shortening was composed by alexithymia. Tryptase is a labile mediator whose level is rather well correlated with MC tumor burden but not to associated symptoms. During allergic reaction in mice, MCs have been shown to be involved in activation of brain regions related to emotion regulation as hypothalamus and amygdalae. This activation appeared to be IgE-dependent and mediated by mast cell degranulation¹⁹. This, together with existing results, suggest that psychological manifestations associated to mastocytosis seems to be more attributable to MC over-reactivity and massive release of mediators in brain than to

the MC burden. Thus, tryptase may not be a good mediator to reveal the interactions between MC and psychopathological aspects of the disease. These findings are reminiscent of our previous report in which we have shown that mediator release related symptoms do not appear linked to MC burden ¹⁴.

Although this study involved a limited sample size, we found clear results showing that, in a MC mediated disease, deficits in emotion regulation as well as negative emotionality are very strongly related to cellular aging. The strength of these relations could sign a particular role of MC in both emotionality and cellular aging. Further research on relations between psychological distress and cellular aging should focus on the role of emotion regulation competences and deficits. The involvement of MC in emotionality seems persuasive. Future research should investigate how MCs are implicated in negative emotionality and emotion regulation deficits present in MC mediated diseases and particularly in mastocytosis. Furthermore, the implication of MC in the relations between emotionality and telomere length as well as MC as a possible target to prevent cellular senescence should be further explored.

In conclusion, in the PBMC of mastocytosis patients, telomerase activity was significantly correlated to negative emotionality (depression, state and trait anxiety, perceived stress) and to emotion regulation deficits (alexithymia and emotion suppression). Emotion regulation deficits are the best predictors of telomere shortening independently of negative emotionality and relations between telomere shortening and negative emotionality are stronger in mastocytosis than in populations without MC-mediated disease. These results suggest that MC infiltration and/or activation in mastocytosis could be responsible for the abnormalities detected in the telomere/telomerase system in this pathology. Deficits in emotion regulatory processes such as alexithymia may have an impact in cellular aging through telomere shortening. MC could be a possible target to prevent aging and to treat psychiatric disorders related to emotion regulation deficits in mastocytosis.

Acknowledgments

The authors wish to thank the following physicians for collecting patient data: Drs. F. Suarez, F. Lanternier, H. Coignard (Paris). We are also grateful to Isabelle Hirsch, Anne-Florence Bellais and Patrick Villarese for technical assistance.

References

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350:569-73.
2. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345:458-60.

3. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27:375-82.
4. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:17312-5.
5. Kao HT CR, Delisi LE, Bertisch HC, Ji F, Gordon D, Li P, Benedict MM, Greenberg WM, Porton B. Rapid telomere erosion in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2008; 13:118-9.
6. O'Donovan A, Lin J, Dhabhar FS, Wolkowitz O, Tillie JM, Blackburn E, et al. Pessimism correlates with leukocyte telomere shortness and elevated interleukin-6 in post-menopausal women. *Brain Behav Immun* 2009; 23:446-9.
7. Wolkowitz O, Epel ES, Reus VI, Mellon SH. Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging. *Depress Anxiety* 2010; 27:327-38.
8. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 1979; 3:349-65.
9. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991; 96:2S-4S.
10. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; 25:603-25.
11. Valent P HH-P, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB et al., editor. Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of tumours. Lyon, france: IARC Press; 2001.
12. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Mast cell proliferative disorders: current view on variants recognized by the World Health Organization. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003; 17:1227-41.
13. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 2009; 113:5727-36.
14. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, Catteau A, Soppelsa F, Baude C, et al. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS ONE* 2008; 3:e2266.
15. Rogers MP, Bloomingdale K, Murawski BJ, Soter NA, Reich P, Austen KF. Mixed organic brain syndrome as a manifestation of systemic mastocytosis. *Psychosom Med* 1986; 48:437-47.
16. Addolorato G, Marsigli L, Capristo E, Caputo F, Dall'Aglio C, Baudanza P. Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. *Hepatogastroenterology* 1998; 45:1559-64.
17. Lehrer PM, Isenberg S, Hochron SM. Asthma and emotion: a review. *J Asthma* 1993; 30:5-21.

18. Nautiyal KM, Ribeiro AC, Pfaff DW, Silver R. Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:18053-7.
19. Costa-Pinto FA, Basso AS, Russo M. Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. *Brain Behav Immun* 2007; 21:783-90.
20. Walter H, von Kalckreuth, A, Schardt, D, Stephan, A, Goschke, S, Erk, S. The temporal dynamics of voluntary emotion regulation. *PLoS ONE* 2009; 4:e6726.
21. Bienenstock J, Tomioka M, Matsuda H, Stead RH, Quinonez G, Simon GT, et al. The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82:238-43.
22. Theoharides T. Autism spectrum disorders and mastocytosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22:859-65.
23. Theoharides TC. Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci* 1990; 46:607-17.
24. Theoharides TC, Spanos C, Pang X, Alferes L, Ligris K, Letourneau R, et al. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology* 1995; 136:5745-50.
25. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*; 130:804-15.
26. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1301-9.
27. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, et al. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol* 1994; 14:190-204.
28. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98:2200-9.
29. Aaron T. Beck RAS, and Gregory K. Brown. Beck Depression Inventory—Second Edition (BDI-II). San Antonio, TX: The Psychological Corporation 1996.
30. Spielberger CD, Gorsush, R.L., Lushene, P.R., Vagg, P.R., Jacobs, A.G. Manual for the State-Trait Anxiety Inventory (Form Y): Consulting Psychologists Press, Inc.: Palo Alto; 1983.
31. Cohen S, Kamarch, T., Mermelstein, R. a global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior* 1983; 24:385-96.
32. Lazarus RS, Folkman, S. Stress, Coping and Adaptation. New York: Springer; 1984.
33. Gross JJ. Emotion regulation: affective, cognitive, and social consequences. *Psychophysiology* 2002; 39:281-91.

34. Bagby RM, Taylor GJ, Parker JD. The Twenty-item Toronto Alexithymia Scale--II. Convergent, discriminant, and concurrent validity. *J Psychosom Res* 1994; 38:33-40.
35. Gross JJ, John OP. Individual differences in two emotion regulation processes: implications for affect, relationships, and well-being. *J Pers Soc Psychol* 2003; 85:348-62.
36. Baron RM, Kenny, DA. The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic and statistical considerations. . *Journal of Personality and Social Psychology* 1986 51 1173-82.
37. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:517-9.
38. Wolfreys K, Oliveira DB. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur J Immunol* 1997; 27:297-306.
39. Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:23-9.
40. Epel ES. Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones (Athens)* 2009; 8:7-22.
41. Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, et al. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry* 2006; 60:432-5.

Table 1. Main features of the population study

Patient number	Sex	Age on diagnosis (years)	Age on inclusion (years)	Valent Stage	Serum tryptase rate mg/L	<i>c-Kit</i> genotype
1	M	77	77	ASM	250	D816V
2	M	43	44	CM	20	D816V
3	M	44	51	ISM	105	WT
4	M	55	55	ISM	29	D816V
5	M	54	54	ASM	51,9	D816V
6	M	35	35	ISM	134	na
7	M	39	45	ASM	19	D816V
8	M	35	42	ASM	92	D816V
9	F	41	43	ISM	90	D816V
10	F	15	36	ISM	5,5	D816V
11	F	21	21	ISM	30	D816V
12	F	26	36	ISM	21,6	D816V
13	F	26	48	ISM	280	WT
14	F	26	31	ISM	1,3	WT
15	F	48	56	ASM	23,2	D816V
16	F	41	42	ISM	98	D816V
17	F	39	40	CM	5	D816V
18	F	44	44	CM	14,8	WT
19	F	67	75	ASM	52	D816V

Abbreviations: M: Male, F: Female, SM: Systemic Mastocytosis, ASM: Aggressive SM, ISM: Indolent SM, CM: Cutaneous Mastocytosis, na: not available

Figures legends

Figure 1. Shortened telomere length is related to depression, perceived stress, state and trait anxiety.

We did Pearson correlation between telomere length, psychological and emotion regulation scores. In nineteen patients, telomeric erosion was significantly correlated depression ($r = -.493$; $p = .032$) (A). Perceived stress was strongly correlated to telomere length after the exclusion of one outlier (patient 4) (perceived stress score: 0; telomere length: 93.30) (before the exclusion ($N=19$): $r = -.469$; $p = .043$; after the exclusion ($N=18$) $r = -.761$; $p < .0001$), High Perceived Stress (PS) relate to scores ≥ 35 (B). After the exclusion of two outliers (patients 11 and 8) (scores 11/8: state anxiety: 74/61; trait anxiety: 51/55; telomere length: 110.2/115.4) telomere length was significantly correlated to state anxiety ($r = -.533$; $p = .028$), SA: State Anxiety (C) and trait anxiety ($r = -.561$; $p = .019$) TA: Trait Anxiety (D).

Figure 1: Shortened Telomere Length is related to depression, state and trait anxiety and perceived stress

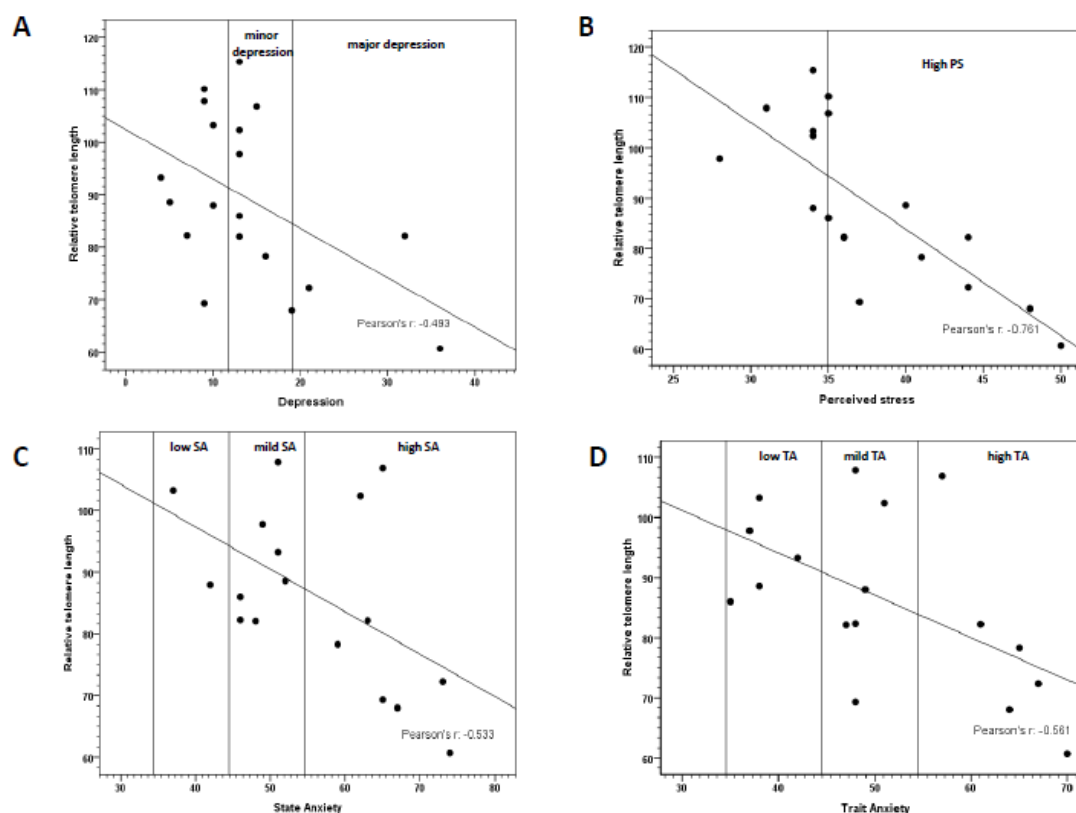


Figure 2. Shortened Telomere Length is related to alexithymia and emotion suppression independently of psychological distress

We used the Pearson correlation between telomere length, alexithymia and emotion suppression. Patients having high scores of alexithymia had shorter telomeres ($r = -.704$; $p = .001$) (A). Patients using more emotion suppression have shorter telomeres ($r = -.668$, $p = .002$) (B). These associations remained highly significant and strong when controlling for all psychological distress measures (depression, anxiety and perceived stress) (alexithymia: ($\beta = -0.608$, $p = 0.009$, $\Delta R^2 = 0.440$); emotion suppression: ($\beta = -0.645$, $p = 0.024$, $\Delta R^2 = 0.357$)).

Figure 2: Shortened Telomere Length is related to alexithymia and emotion suppression independently of psychological distress

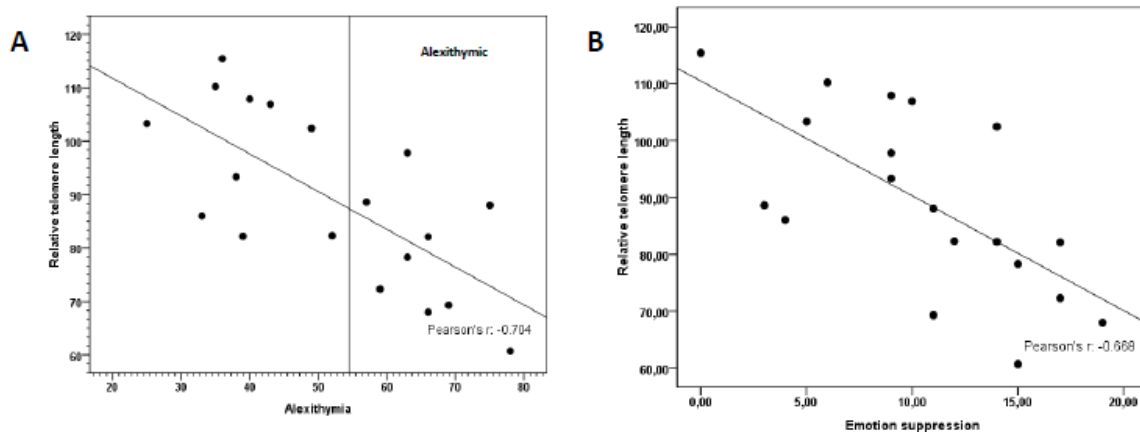


Figure 3. How MC could lead to cellular aging: “Top down”, “Bottom up” and “Synergic independent ways” Hypothesis.

Arrows “1”: “Top down” hypothesis: Negative emotionality influences Mast cells activity which directly influence on telomere length. Arrows “2”: Bottom up” hypothesis: Mast cells influence emotion regulation capacities which lead to consequent negative emotionality and/or telomere shortening. Arrows “3”: “Synergic independent ways” hypothesis: Mast cell and emotionality influences telomere shortening directly and independently.

Figure 3: How MC could lead to cellular aging: Top down (1), Bottom up (2) and Synergic independent ways (3) Hypothesis

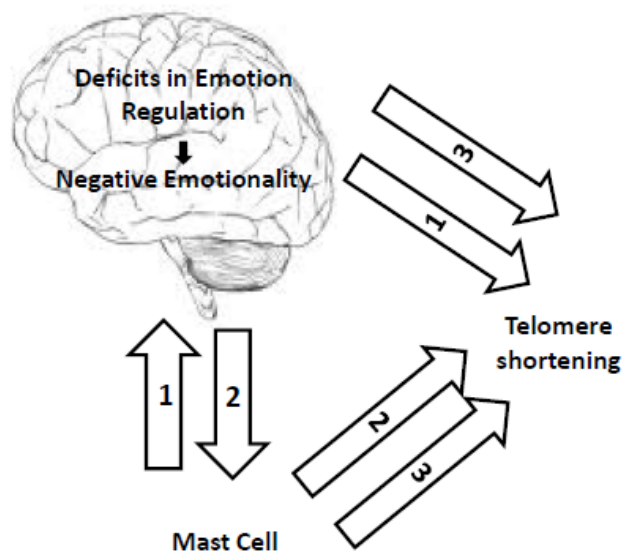
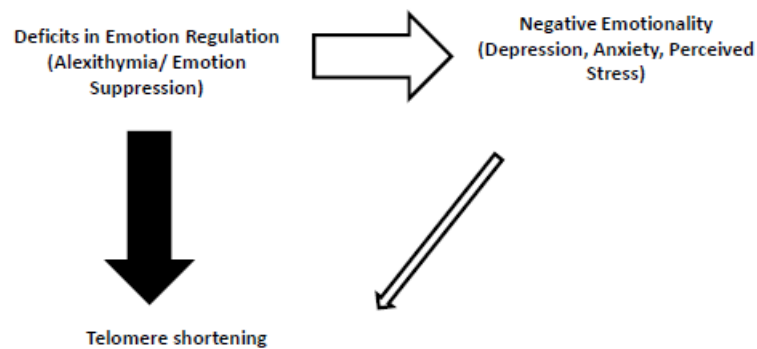


Figure 4. How emotionality could lead to cellular aging

Deficits in Emotion Regulation Process as Alexithymia and/or Emotion Suppression could affect telomere length through a direct action independently of negative emotionality and/or through an indirect action passing by the generation of negative emotionality.

Figure 4: How Emotionality could lead to cellular aging



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Travail sur la régression des formes pédiatriques et l'expression de la télomérase.

Notre hypothèse de départ était qu'il existait une différence d'expression de la télomérase entre les enfants et les adultes atteints de mastocytose afin d'expliquer pourquoi la maladie régresse uniquement chez les enfants et pas chez les adultes. Nous avons étayé cette hypothèse en comparant des biopsies cutanées d'enfants et d'adultes très infiltrées par des mastocytes. Nos résultats portant sur une large cohorte de sujets, montrent que la sous unité catalytique de la télomérase, hTERT est significativement plus exprimée chez les adultes que chez les enfants. Nous avons utilisé deux techniques différentes pour le montrer : l'expression de l'ARNm extrait de biopsies cutanées d'une part et l'expression de la protéine par immunohistochimie sur les blocs qui ont servi à poser le diagnostic de mastocytose. Nous avons aussi confirmé que la télomérase était activée et fonctionnelle dans des mastocytes primaires humains isolés dans la moelle de patients adultes atteints de mastocytose, puisqu'une activité télomérasique a été dépistée par la technique du Q TRAP, alors que nous n'avons pas retrouvée d'activité télomérasique dans des mastocytes primaires humains issus de contrôles sains et qu'une publication de l'équipe de Metcalfe avait montré qu'au cours de la différenciation mastocytaire, l'activité télomérasique diminuait pour être nulle au stade de mastocyte mature ⁶⁴.

La différence d'expression d'hTERT observée entre les enfants et les adultes permet d'émettre l'hypothèse que les mastocytes pathologiques pédiatriques prolifèrent, sont

responsables d'une maladie cutanée, mais lorsque leurs télomères ont raccourci, en l'absence de réactivation suffisante de la télomérase, ils entrent en sénescence puis meurent par apoptose ce qui expliquerait pourquoi la maladie régresse spontanément à l'adolescence. Pour confirmer cette hypothèse *in vivo* chez les enfants, il faudrait disposer de biopsies cutanées du même sujet à des âges différents, par exemple au diagnostic qui est souvent posé avant 3 ans, puis à l'adolescence où les manifestations diminuent puis cèdent et comparer la longueur des télomères des mastocytes (raccourcissement) et la variation de la masse tumorale (diminution). En pratique, ce n'est pas réalisable, car on ne peut pas proposer d'un point de vue éthique des biopsies itératives à visée uniquement de recherche chez des enfants. La seule biopsie théoriquement autorisée est celle du diagnostic initial.

Nous allons essayer cependant de mesurer par immunoFISH la longueur des télomères dans les mastocytes des biopsies cutanées des adultes et des enfants chez qui nous avons regardé l'expression d'hTERT par immunohistochimie. Les mastocytes seront repérés par le c-Kit et les télomères par une sonde CCAGGG couplée à un fluorochrome. Nous essayerons ensuite de montrer que la longueur moyenne des télomères mesurée dans les mastocytes des adultes est plus longue que celle des enfants. Cependant, s'il n'existe pas de différence, on ne pourra pas conclure, car le début de la maladie dans les formes pédiatriques touche souvent des enfants très jeunes (moins de 3 ans), ainsi, la longueur des télomères peut être encore longue à ce stade, donc au moment de la biopsie cutanée, et ne raccourcir qu'à l'adolescence après sénescence proliférative.

Après avoir montré une différence d'expression d'hTERT par RT Q PCR entre les enfants et les adultes, nous avons regardé *in vivo* si cette différence pouvait être due aux mutations de *c-Kit* qui sont différentes entre les enfants et les adultes. En RT Q PCR, nous disposons d'une cohorte suffisante pour faire la comparaison, mais pas entre enfants et adultes, car les adultes

sont à de rares exceptions tous mutés en D816V, mais au sein de la cohorte pédiatrique, entre les mutants PTD et ECD. L'expression d'hTERT est significativement plus élevée en cas de mutation PTD (n=9) qu'en cas de mutation ECD (n=22) de *c-Kit* (p=0.0013). Nous avons ensuite voulu confirmer cette donnée *in vitro* sur des BMMC de souris infectées par les mutants humains ECD et PTD de *c-Kit*. Nous avons choisi des cellules primaires car elles n'expriment pas la télomérase de façon constitutive. L'étude de la sénescence par le test à la beta galactosidase nous a permis de montrer que les BMMC ayant intégré la mutation PTD de *c-Kit* entrent moins vite en sénescence que les BMMC ayant intégré la mutation ECD de *c-Kit*. Nous avons aussi montré par Q FISH que la longueur des télomères des BMMC ayant intégré la mutation PTD est significativement plus longue que celles des autres BMMC (WT et mutation ECD). Ces manipulations nous confortent dans notre hypothèse. Nous sommes en train de mesurer l'activité de la télomérase par Q TRAP dans les extraits cellulaires des différents types de BMMC.

L'équipe de Patrice Dubreuil a récemment montré que les mutants PTD de *c-Kit* signalaient préférentiellement par la voie STAT3 et STAT5, alors que les mutants ECD de *c-Kit* signalaient davantage par la voie AKT ⁴². Nous projetons de regarder si ces différences de signalisation intracellulaires observées entre les mutants adultes et pédiatriques sont ou non associées à la différence d'expression de la télomérase. Ainsi, par immunohistochimie, un marquage phospho-AKT et phospho-STAT 3 sera réalisé sur les biopsies cutanées déjà étudiées lors du double marquage c-Kit et hTERT. Nous essayerons de voir si phospho-AKT est davantage exprimé sur les biopsies cutanées d'enfants avec mutations ECD de *c-Kit* par rapport aux biopsies d'adultes avec mutations PTD de *c-Kit* ; et si à l'inverse phospho-STAT3 est ou non surexprimé sur les biopsies cutanées d'adultes avec mutations PTD de *c-Kit* par rapport aux enfants avec mutations ECD de *c-Kit*. Une telle corrélation pourrait indiquer que

la mutation PTD de *c-Kit* active hTERT via STAT3 alors que la mutation ECD de *c-Kit* inhibe ou n'active pas hTERT via la AKT.

Enfin, des manipulations sont actuellement en cours sur des fibroblastes primaires humains (HDF) que nous avons infectés avec les différents mutants de *c-Kit* (ECD et PTD). Nous essayons de leur transfecter un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur de hTERT et d'analyser son activité luciférase. Nous regarderons aussi si cette activité est ou non modulée par la cotransfection d'un dominant négatif de STAT3 et d'un inhibiteur d'AKT.

En introduction, j'ai évoqué l'existence de tumeurs pédiatriques qui ont la particularité de régresser avant l'adolescence. Des équipes ont montré que la régression ou le caractère bénin de ces tumeurs était associé à une faible expression de la télomérase par rapport à des tumeurs récidivantes ou agressives. Ils ont discuté l'intérêt de mesurer la longueur des télomères et l'activité télomérasique des cellules de ces tumeurs lors de la biopsie diagnostic ou lors du suivi évolutif afin de pouvoir prédire l'évolutivité de la tumeur chez les enfants atteints. Par analogie, on pourrait discuter dans la mastocytose pédiatrique qui ne régresse pas à l'adolescence, ce qui est rare mais décrit, de faire un marquage hTERT en immunohistochimie et de mesurer la longueur des télomères *in situ* afin d'établir le pronostic de la maladie en plus de la recherche d'une éventuelle mutation de *c-Kit*.

Enfin, nous avons été surpris de ne pas trouver d'expression de la télomérase dans les tissus des deux patients atteints des sarcomes mastocytaire et qui n'étaient pas porteurs de la mutation PTD de *c-Kit*. En effet, selon notre hypothèse, ces patients étant porteurs pour l'un d'un *c-Kit* sauvage et pour l'autre d'une mutation du domaine juxtamembranaire de *c-Kit*, nous nous attendions à ce qu'ils présentent une mastocytose de type pédiatrique, donc cutanée et spontanément régressive. Or leur maladie était très agressive et ils sont décédés en quelques

mois, ce qui nous a incités à rechercher d'autres mécanismes responsables d'une transformation oncogénique de leurs mastocytes tumoraux.

La mise en évidence par CGH pour le premier (Mr B, WT) d'anomalies génétiques importantes probablement suite à un raccourcissement télomérique majeur est très intéressante. Elle souligne l'utilité de cette technique dans les formes agressives de mastocytose et en l'absence de mutation PTD de *c-Kit* et peut aussi nous permettre d'envisager un suivi du frère de ce patient. En effet, il s'agissait d'une mastocytose familiale et le frère du défunt patient est encore en vie et présente une mastocytose cutanée pédiatrique. Nous allons pouvoir régulièrement le prélever et au moindre doute comparer son ADN à celui de la tumeur mastocytaire de son frère afin de dépister d'éventuelles anomalies précliniques.

La mise en évidence d'un phénomène d'ALT pour le second (Mr L, muté en 560 sur *c-Kit*) a été très intéressante, car il s'agissait d'un patient plus âgé que le précédent (42 ans), sans histoire familiale, et avec une mutation rarement décrite chez l'adulte touchant le domaine juxtamembranaire de *c-Kit*. Il présentait un syndrome tumoral franc avec volumineuse splénomégalie et a évolué vers une leucémie à mastocytes en fin de vie. Le phénomène d'ALT a été mis en évidence par immunofluorescence grâce à une collaboration avec l'équipe d'Arturo-Londono de l'institut Curie. En cas de mastocytose agressive chez l'adulte non muté sur le PTD de *c-Kit*, une recherche de phénomène ALT pourra être effectuée et être utile à visée pronostic.

Il nous reste pour ces patients à essayer de mesurer la longueur des télomères dans les mastocytes par Q FISH et montrer qu'elle est allongée en l'absence de réactivation de la télomérase.

Perspectives :

Nous allons essayer de mesurer la longueur des télomères par la technique de Q FISH des mastocytes infiltrant les biopsies cutanées des enfants et des adultes pour lesquels nous avons fait les marquages hTERT en immunohistochimie. Nous essayerons de comparer les moyennes des longueurs des télomères entre le groupe des enfants et le groupe des adultes d'une part et d'autre part de comparer chacune de ces moyennes à la longueur moyenne des télomères des mastocytes de biopsies cutanées contrôles d'enfants et d'adultes.

Afin de savoir si l'on peut relier l'ensemble de ces phénomènes à une signalisation différentielle observée entre les mutations ECD et PTD de *c-Kit* et les deux évolutions de la maladie, nous tenterons de relier ou d'identifier les voies/effecteurs initiateurs de ces phénomènes.

Une collaboration avec l'équipe d'Isabelle Plo de l'IGR a débuté afin d'essayer de comprendre comment certaines formes agressives chez l'adulte entraînent une instabilité génomique favorisant l'apparition d'anomalies génétiques additionnelles.

Enfin, nous essayerons de savoir s'il on peut corrélérer la réponse thérapeutique différentielle aux différences de signalisations/mutations. En effet, seules les mutations PTD résistent au Glivec¹⁰⁹ et seules les ECD résistent à la rapamycine¹¹⁰. Nous tenterons d'identifier si les mécanismes moléculaires responsables de l'efficacité de ces molécules sont ou non liées à l'activation ou l'inhibition de la télomérase.

Les retombées à terme, seront de déduire de nouvelles cibles/stratégies thérapeutiques pour le traitement de cette maladie incurable chez l'adulte.

Travail sur le système télomères/téломérase et les troubles psychiatriques rencontrés au cours de la mastocytose de l'adulte.

Notre travail a porté sur l'étude du système télomères/ télomérase chez 19 adultes suivis pour mastocytose. La longueur des télomères des PBMC était mesurée par Southern blot et l'activité télomérasique mesurée par Q TRAP. Chaque patient a complété un questionnaire sur son ressenti psychologique nous permettant d'évaluer son émotivité négative (stress perçu, anxiété, dépression) et ses déficits de régulation émotionnelle (alexithymie et suppression des émotions). L'alexithymie étant l'incapacité de la part d'un individu à verbaliser ses émotions.

Nous avons mis en évidence chez les patients une corrélation ente le raccourcissement des télomères, une fréquence élevée d'émotivité négative et des déficits de régulation des émotions comme l'alexithymie et les stratégies de suppression des émotions indépendamment d'une émotivité négative. Ces corrélations sont plus fortes chez nos patients que dans les populations n'ayant pas de maladie médiée par les mastocytes, suggérant que les mastocytes pourraient constituer le chaînon manquant entre les troubles psychiques et le raccourcissement des télomères, phénomène déjà rapporté dans la littérature ⁹²⁻⁹⁴.

Dans notre population d'adultes avec mastocytose, l'érosion télomérique n'était pas compensée par une réactivation la télomérase. Ceci suggère soit un phénomène de vieillissement accéléré des PBMC sans élévation subséquente de l'activité de la télomérase pour compenser ou rallonger les télomères, soit une sénescence proliférative accrue des PBMC. La diminution de l'espérance de vie des PBMC au cours de la mastocytose adulte pourrait être consécutive à une augmentation du stress oxydatif cellulaire en réponse à la détresse psychologique. Pour expliquer ce phénomène, nous avons émis l'hypothèse que le stress psychologique pourrait induire un stress oxydatif cellulaire, qui pourrait conduire à une érosion télomérique et ainsi

diminuer la survie cellulaire en l'absence de réactivation de la télomérase. À cet égard, il est intéressant de noter que les mastocytes peuvent relarguer des substances oxydantes en réponse à divers stimuli indépendamment de la stimulation de l'IgE et il est tentant de spéculer que les stimuli neurologiques pourraient être l'un d'entre eux ¹¹¹⁻¹¹³.

Tous les patients ont présenté des niveaux importants d'émotions négatives caractérisées par des scores élevés d'anxiété ainsi que par de stress perçu, d'alexithymie et de dépression. De façon cohérente avec d'autres études, les réactions émotionnelles négatives (dépression, stress perçu et anxiété) sont corrélées à la présence de télomères raccourcis ^{92-94, 114, 115}. Nous montrons ici pour la première fois cette corrélation dans une population souffrant d'une maladie médiée par les mastocytes. De façon intéressante, malgré le petit effectif de notre cohorte de patients, la corrélation entre le stress perçu et la longueur des télomères était plus forte dans la mastocytose que dans la précédente étude portant sur une population sans une maladie médiée par le mastocyte ⁹².

Ainsi, nos résultats soutiennent notre hypothèse de départ qui consistait à dire que les mastocytes étaient impliqués dans ce phénomène. Trois hypothèses peuvent être soulevées pour l'expliquer: 1) L'émotivité négative influe sur l'activité des mastocytes, qui modifient directement la longueur des télomères. 2) Les mastocytes influencent les capacités de régulation des émotions entraînant la production d'émotions négatives et/ou un raccourcissement télomérique. 3) Les mastocytes et les déficits de régulation des émotions influent directement sur le raccourcissement des télomères et indépendamment de l'émotivité (hypothèse de voies indépendantes mais synergiques).

Indépendamment de la présence ou non de réactions émotionnelles négatives, les déficits des processus de régulation des émotions comme les stratégies de répression des émotions et

l'alexithymie sont apparues fortement prédictifs du raccourcissement télomérique dans une maladie rare médiée par les mastocytes caractérisée par une activation spontanée des mastocytes. Ce résultat suggère un rôle particulier des processus de régulation des émotions et du vieillissement cellulaire dans la mastocytose. Nous n'avons pas pu prouver si cette relation était médiée par les mastocytes précisément mais nous avons montré que la meilleure situation prédictive du raccourcissement télomérique est l'alexithymie. La tryptase est un médiateur labile dont le niveau est plutôt bien corrélé avec la masse tumorale mastocytaire, mais pas aux symptômes associés. Au cours d'une réaction allergique chez la souris, il a été montré que les mastocytes sont impliqués dans l'activation des régions du cerveau associées à la réglementation de l'émotion comme l'hypothalamus. Cette activation semblait IgE dépendante et médiée par la dégranulation des mastocytes ¹¹⁶. Associées à nos résultats, ces données suggèrent que les manifestations psychologiques rencontrées au cours de la mastocytose semblent être davantage attribuables à l'hyperactivation des mastocytes et à leur relargage massif de neuromédiateurs dans le cerveau plutôt qu'à la masse tumorale mastocytaire. Ainsi nous pensons que la tryptase sérique n'est pas un bon médiateur pour témoigner des interactions entre le mastocyte et les aspects physiopathologiques de la maladie. Ces conclusions rappellent un des précédents travaux de notre équipe dans lequel nous avons montré que les symptômes liés à la libération de médiateurs n'apparaissent pas liés à la masse tumorale mastocytaire ²⁷.

Bien que cette étude porte sur un échantillon limité de patients, nos résultats montrent que, dans une maladie MC médiée par les mastocytes, les déficits de régulation des émotions ainsi que les réactions émotionnelles négatives sont très fortement liés au vieillissement cellulaire. La force de ces relations pourrait signer un rôle privilégié du mastocyte à la fois dans l'émotivité et le vieillissement cellulaire. Dans le cadre des recherches sur les relations entre

les troubles psychologiques et vieillissement cellulaire il serait intéressant de se concentrer sur le rôle des défauts ou des aptitudes à réguler les émotions. L'implication des mastocytes dans l'émotivité semble convaincante. Dans le futur, il faudrait étudier comment les mastocytes sont impliqués dans la genèse d'émotions négatives et dans les déficits de régulation des émotions rencontrés au cours de la mastocytose. En outre, l'implication des mastocytes dans les relations entre l'émotivité et longueur du télomère pourra être explorée, ainsi que le mastocyte comme une cible potentielle pour empêcher la sénescence cellulaire.

En conclusion, dans le PBMC des patients adultes atteints de mastocytose, la longueur des télomères est significativement corrélée à la présence de réactions émotionnelles négatives (dépression, anxiété, stress perçu) et aux déficits de régulation des émotions (alexithymie et suppression des émotions). Les déficits de régulation des émotions sont les meilleurs troubles psychologiques prédictifs du raccourcissement des télomères indépendamment des réactions émotionnelles négatives. Les relations entre le raccourcissement télomérique et les réactions émotionnelles négatives sont plus fortes dans la mastocytose que dans les populations sans maladie médiée par les mastocytes. Ces résultats suggèrent que l'infiltration et/ou l'activation par les mastocytes dans la mastocytose de l'adulte pourrait être responsable des anomalies du système télomère/téломérase détectées dans cette pathologie. Les déficits dans les processus de régulation des émotions comme l'alexithymie pourraient avoir un impact sur le vieillissement cellulaire par l'érosion télomérique. Le mastocyte pourrait dans le futur constituer une cible potentielle pour prévenir le vieillissement cellulaire et pour traiter les troubles psychiatriques liés à des déficits de la régulation des émotions rencontrées au cours de la mastocytose.

Perspectives :

Il serait intéressant de confirmer ces données sur une plus grande cohorte de patients atteints de mastocytose et en utilisant la technique de Q PCR pour mesurer la longueur des télomères. Deux cohortes de contrôles pourraient être prises : des sujets avec dépression sans maladie mastocytaire et des sujets avec une maladie chronique non liée aux mastocytes et responsable d'un stress psychologique (comme le lupus ou la polyarthrite rhumatoïde).

Perspectives générales

Après 4 années passées dans le secteur de la recherche, mon retour à la clinique s'effectue dans un hôpital orienté vers les pathologies cardiovasculaires (Hôpital Européen Georges Pompidou). J'envisage de m'intégrer dans le laboratoire de recherche sur l'immunologie et l'athérosclérose d'Alain Tedgui afin d'y appliquer mes connaissances sur le mastocyte normal et pathologique ainsi que le système télomères/télomérase. En effet, il a été montré que les mastocytes sont présents dans les plaques d'athérosclérose ¹¹⁷ d'une part et que le système télomères/télomérase est anormal en cas de divers pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque ¹¹⁸⁻¹²¹. Plusieurs hypothèses pourront être formulées afin de tenter de mieux comprendre la physiopathologie de l'athérosclérose via le mastocyte et/ou le vieillissement accéléré de l'endothélium vasculaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fain O, Stirnemann J, Eclache V, et al. [Systemic mastocytosis]. *Presse Med* 2005;34:681-7.
2. Georgin-Lavialle S, Barete S, Suarez F, et al. [Current concepts and treatment advances in systemic mastocytosis]. *Rev Med Interne* 2009;30:25-34.
3. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Swee RG. Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1988;67:345-68.
4. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 1979;3:349-65.
5. Parwaresch MR, Horny HP, Lennert K. Tissue mast cells in health and disease. *Pathology, research and practice* 1985;179:439-61.
6. Agis H, Willheim M, Sperr WR, et al. Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit+, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony-forming cell. *J Immunol* 1993;151:4221-7.
7. Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol* 1992;148:772-7.
8. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 1999;94:2333-42.
9. Rottem M, Okada T, Goff JP, Metcalfe DD. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34+/Fc epsilon RI- cell population. *Blood* 1994;84:2489-96.
10. Valent P, Bevec D, Maurer D, et al. Interleukin 4 promotes expression of mast cell ICAM-1 antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3339-42.
11. Payne V, Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 2004;59:695-703.
12. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, et al. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:735-9.
13. Valent P, Bettelheim P. Cell surface structures on human basophils and mast cells: biochemical and functional characterization. *Advances in immunology* 1992;52:333-423.
14. Valent P, Spanblochl E, Bankl HC, et al. Kit ligand/mast cell growth factor-independent differentiation of mast cells in myelodysplasia and chronic myeloid leukemic blast crisis. *Blood* 1994;84:4322-32.
15. Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 1992;80:2237-45.
16. McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. *Journal of leukocyte biology* 1995;58:14-22.
17. Valent P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Experimental dermatology* 1995;4:255-9.
18. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1053-74.
19. Schwartz LB. Mast cells and basophils. *Clinical allergy and immunology* 2002;16:3-42.

20. Lortholary O, Audouin J, Le Tourneau A, Diebold J. [The mast cell and its pathology (1). Nosology and physiopathology of mast cell hyperplasia and proliferation]. *Annales de pathologie* 1991;11:18-24.
21. Lortholary O, Audouin J, Le Tourneau A, Diebold J. [The mast cell and its pathology. 2: Histopathology of mastocytosis]. *Annales de pathologie* 1991;11:92-100.
22. Marrache F, Memain N, Bonte I, et al. [Treatment of systemic mastocytosis]. *Rev Med Interne* 2003;24:594-601.
23. Fine J. Mastocytosis. *International journal of dermatology* 1980;19:117-23.
24. Chang A, Tung RC, Schlesinger T, Bergfeld WF, Dijkstra J, Kahn TA. Familial cutaneous mastocytosis. *Pediatric dermatology* 2001;18:271-6.
25. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 2009;113:5727-36.
26. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood* 2009;114:3769-72.
27. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, et al. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS ONE* 2008;3:e2266.
28. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92:1736-44.
29. Tsujimura T. Role of c-kit receptor tyrosine kinase in the development, survival and neoplastic transformation of mast cells. *Pathol Int* 1996;46:933-8.
30. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001;25:571-6.
31. Akin C, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med* 2004;55:419-32.
32. Akin C, Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:13-9; quiz 20.
33. Feger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:110-4.
34. Kitayama H, Tsujimura T, Matsumura I, et al. Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood* 1996;88:995-1004.
35. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10560-4.
36. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-72.
37. Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004;11:58-64.
38. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103:3222-5.
39. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1115-24.

40. Zhang Y, Schlegelberger B, Weber-Matthiesen K, Grote W, Bartels H. Translocation (X;8)(q27;q21.3) in a case of systemic mastocytosis. *Cancer genetics and cytogenetics* 1994;78:236-8.
41. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *The Journal of investigative dermatology*;130:804-15.
42. Yang Y, Letard S, Borge L, et al. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood*;116:1114-23.
43. Larroche C, Chadenat ML, Chaunu MP, Abad S, Casassus P, Dhote R. [Strokes associated with cervical artery dissection, and systemic mastocytosis: an unfortuitous association? A report of two cases]. *Rev Med Interne* 2005;26:820-3.
44. Kiszewski AE, Duran-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutierrez-Castrellon P, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:285-90.
45. Fain O, Stirnemann J, Lortholary O. [Systemic mastocytosis]. *Rev Prat* 2005;55:1629-36.
46. Valent P, Sperr WR, Akin C. How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood*;116:5812-7.
47. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661-73.
48. Blackburn EH, Challoner PB. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 1984;36:447-57.
49. Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D. Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 1989;31:553-60.
50. Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2034-43.
51. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993;52:661-7.
52. Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 1999;36:267-78.
53. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998;16:743-7.
54. Cech TR. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 2004;116:273-9.
55. Djojotubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 2003;15:164-75.
56. Yu GL, Blackburn EH. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*. *Cell* 1991;67:823-32.
57. Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 1996;144:1399-412.
58. Lingner J, Cech TR. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10712-7.
59. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science (New York, NY)* 1997;276:561-7.
60. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes & development* 1998;12:1073-85.

61. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* (New York, NY 1994;266:2011-5.
62. Wu YY, Hruszkewycz AM, Delgado RM, et al. Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2000;293:199-212.
63. Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clinical chemistry* 2001;47:519-24.
64. Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM, et al. Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines. *J Immunol* 2001;166:6647-56.
65. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature medicine* 1997;3:1271-4.
66. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO journal* 1995;14:4240-8.
67. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature genetics* 2000;26:447-50.
68. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer letters* 2003;194:155-62.
69. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Experimental gerontology* 2001;36:1619-37.
70. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.
71. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* 1965;37:614-36.
72. Gire V, Wynford-Thomas D. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Molecular and cellular biology* 1998;18:1611-21.
73. Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *The Journal of cell biology* 1999;144:589-601.
74. Michishita E, Nakabayashi K, Ogino H, Suzuki T, Fujii M, Ayusawa D. DNA topoisomerase inhibitors induce reversible senescence in normal human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 1998;253:667-71.
75. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998;16:1113-23.
76. Akiyama M, Yamada O, Kanda N, et al. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer letters* 2002;178:187-97.
77. Gao XD, Chen YR. Inhibition of telomerase with human telomerase reverse transcriptase antisense increases the sensitivity of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Asian journal of andrology* 2007;9:697-704.
78. Li S, Ferguson MJ, Hawkins CJ, Smith C, Elwood NJ. Human telomerase reverse transcriptase protects hematopoietic progenitor TF-1 cells from death and quiescence induced by cytokine withdrawal. *Leukemia* 2006;20:1270-8.
79. Misawa M, Tauchi T, Sashida G, et al. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *International journal of oncology* 2002;21:1087-92.

80. Wu P, Meng L, Wang H, et al. Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 2005;335:36-44.
81. Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002;21:553-63.
82. Masutomi K, Possemato R, Wong JM, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8222-7.
83. Shin KH, Kang MK, Dictrow E, Kameta A, Baluda MA, Park NH. Introduction of human telomerase reverse transcriptase to normal human fibroblasts enhances DNA repair capacity. *Clin Cancer Res* 2004;10:2551-60.
84. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, NY)* 1998;279:349-52.
85. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998;8:279-82.
86. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1931-41.
87. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, et al. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nature genetics* 1998;19:182-6.
88. Yan P, Coindre JM, Benhattar J, Bosman FT, Guillou L. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer research* 1999;59:3166-70.
89. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12683-8.
90. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nature genetics* 2001;28:155-9.
91. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999;96:701-12.
92. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17312-5.
93. Epel ES. Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones (Athens, Greece)* 2009;8:7-22.
94. Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, et al. Dynamics of telomerase activity in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2009;24:531-9.
95. Puterman E, Lin J, Blackburn E, O'Donovan A, Adler N, Epel E. The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length. *PLoS One*;5:e10837.
96. Evans AE, Chatten J, D'Angio GJ, Gerson JM, Robinson J, Schnauffer L. A review of 17 IV-S neuroblastoma patients at the children's hospital of philadelphia. *Cancer* 1980;45:833-9.
97. Schmandt SM, Packer RJ, Vezina LG, Jane J. Spontaneous regression of low-grade astrocytomas in childhood. *Pediatric neurosurgery* 2000;32:132-6.
98. McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults--1977-1988. *Neurosurgery* 1992;31:636-42; discussion 42.
99. Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997;3:523-30.
100. Zipursky A. Transient leukaemia--a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. *British journal of haematology* 2003;120:930-8.

101. Holt SE, Brown EJ, Zipursky A. Telomerase and the benign and malignant megakaryoblastic leukemias of Down syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:14-7.
102. Tabori U, Vukovic B, Zielenska M, et al. The role of telomere maintenance in the spontaneous growth arrest of pediatric low-grade gliomas. *Neoplasia* (New York, NY 2006;8:136-42.
103. Tabori U, Ma J, Carter M, et al. Human telomere reverse transcriptase expression predicts progression and survival in pediatric intracranial ependymoma. *J Clin Oncol* 2006;24:1522-8.
104. Didiano D, Shalaby T, Lang D, Grotzer MA. Telomere maintenance in childhood primitive neuroectodermal brain tumors. *Neuro-oncology* 2004;6:1-8.
105. Binz N, Shalaby T, Rivera P, Shin-ya K, Grotzer MA. Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells. *Eur J Cancer* 2005;41:2873-81.
106. Slater DN. The new World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification for cutaneous lymphomas: a practical marriage of two giants. *The British journal of dermatology* 2005;153:874-80.
107. Bories N, Thomas L, Phan A, et al. [Lymphomatoid papulosis in childhood: six case reports and a literature review]. *Annales de dermatologie et de venerologie* 2008;135:657-62.
108. de Souza A, Camilleri MJ, Wada DA, Appert DL, Gibson LE, el-Azhary RA. Clinical, histopathologic, and immunophenotypic features of lymphomatoid papulosis with CD8 predominance in 14 pediatric patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2009;61:993-1000.
109. Zermati Y, De Sepulveda P, Feger F, et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene* 2003;22:660-4.
110. Gabillot-Carre M, Lepelletier Y, Humbert M, et al. Rapamycin inhibits growth and survival of D816V-mutated c-kit mast cells. *Blood* 2006;108:1065-72.
111. Baron RM, Kenny, DA. The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic and statistical considerations. *Journal of Personality and Social Psychology* 1986 51 1173-82.
112. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Current drug targets* 2005;4:517-9.
113. Wolfreys K, Oliveira DB. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *European journal of immunology* 1997;27:297-306.
114. O'Donovan A, Lin J, Dhabhar FS, et al. Pessimism correlates with leukocyte telomere shortness and elevated interleukin-6 in post-menopausal women. *Brain Behav Immun* 2009;23:446-9.
115. Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2005;5:23-9.
116. Costa-Pinto FA, Basso AS, Russo M. Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. *Brain Behav Immun* 2007;21:783-90.
117. Lindstedt KA, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells in vulnerable atherosclerotic plaques--a view to a kill. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007;11:739-58.
118. Butt HZ, Atturu G, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Telomere length dynamics in vascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*;40:17-26.
119. Demerath EW, Cameron N, Gillman MW, Towne B, Siervogel RM. Telomeres and telomerase in the fetal origins of cardiovascular disease: a review. *Human biology; an international record of research* 2004;76:127-46.
120. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008;198:347-53.

121. van der Harst P, de Boer RA, Samani NJ, et al. Telomere length and outcome in heart failure. *Annals of medicine*;42:36-44.

ANNEXES

Liste des publications et communications relatives à la mastocytose et /ou au système télomères/téломérase.

Publications

Revues anglophones :

Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal P, Hadj-Rabia S, Yang Y, Nasca L, Cohen-Akenine A, Barete S, Feger F, Arock M, Catteau B, **Georgin-Lavialle S**, Sans B, Stalder J-F, Skowron F, Thomas L, Lorette G, Plantin P, Bordigoni P, Lortholary O, de Prost Y, Sobol H, Moussy A and Dubreuil P. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D⁸¹⁶V and other activating *c-Kit* mutations. *J Invest Dermatol*. 2010 Mar;130(3):804-15.

Sokol H, **Georgin-Lavialle S**, Grandpeix-Guyodo C, Canioni D, Barete S, Dubreuil P, Lortholary O, Beaugier L, Hermine O. Gastrointestinal involvement and manifestations in systemic mastocytosis. *Inflam Bowel Dis*. 2010 Jul;16(7):1247-53. Revue

Georgin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, Lepelletier Y, Gabet A-S, Hermine O. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic diseases. *Autoimmunity Reviews*, Volume 9, Issue 10, August 2010, Pages 646-651. Revue

Georgin-Lavialle S, Baude C, Feger F, Barete S, Lhermitte L, Letard S, De Gennes C, Suarez F, Damaj G, Grandpeix-Guyodo C, Palmerini F, Hanssens K, Asnafi V, Lortholary O, Dubreuil P, Lepelletier Y, Hermine O. Blood CD34⁺CD33⁺CD117⁺ cells rate correlates to aggressive forms of systemic mastocytosis and constitute a mast cell precursor. *En revision à Blood (brief report)*.

Georgin-Lavialle S, Suarez F, Lepelletier Y, Yang Y, Letard S, Hanssens K, Feger F, Renand A, Lhermitte L, Brouze C, Grandpeix-Guyodo C, Canioni D, Asnafi V, Gineste P, Macintyre E, Mansfield C, Moussy A, Dubreuil P and Hermine O. Mast cell leukemia: identification of a new *c-Kit* mutation, dup(501-502), and response to masitinib. *Soumis au European Journal of Haematology (article original)*.

Sophie Georgin-Lavialle, Houcine Bougherara, Gandhi Damaj, Catherine Grandpeix-Guyodo, Jean-Marie Launay, Frédéric Subra, Ludovic Lhermitte, Vahid Asnafi, Christian Auclair, Michel Arock, Patrice Dubreuil, Olivier Hermine, Marie-Alix Poul. KIT mutant inhibition: relevance in diagnostic and prognostic of systemic mastocytosis. *Soumis au British Journal of Haematology (brief report)*.

Sophie Georgin-Lavialle, Daniela Silva Moura, Anne-Sophie Gabet, Anne-Laure Gacon, Catherine Grandpeix-Guyodo, Gandhi Damaj, Jean-Marie Launay, Isabelle Durieu, Aurélie Esparcieux, Isabelle Guichard, Agnès Sparsa, Franck Nicolini, Frédérique Navaux, Marie-Olivia Chandesris, Stéphane Barete, Olivier Lortholary, Patrice Dubreuil, Serge Sultan, Olivier Hermine. Telomere shortening in mastocytosis is associated with depression, stress, anxiety and emotion regulation deficits. *En révision au Journal of Allergy and Clinical Immunology (article original)*.

Revues françaises :

S. Georgin-Lavialle, S. Barete, F. Suarez, Y Lepelletier, C. Bodemer, P. Dubreuil, O. Lortholary, O. Hermine. Actualités sur la compréhension et le traitement des mastocytoses systémiques. *Rev Med Int.* 2009 Jan;30(1):25-34. Revue

S. Georgin-Lavialle, A. Aouba, Y. Lepelletier, A-S. Gabet, O. Hermine. Télomères et télomérase : intérêts et perspectives dans le lupus érythémateux systémique. *Rev Med Int.* 2010 May;31(5):345-52. Revue

Communications orales

S. Georgin-Lavialle, C. Baude, Y. Lepelletier, F. Feger, F. Suarez, S. Barete, C. de Gennes, G. Damaj, O. Lortholary, P. Dubreuil, O. Hermine. Intérêts du phénotype sanguin au cours de la mastocytose systémique : résultats de l'étude de 51 patients. 58^{ème} congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Bordeaux, 11-13 décembre 2008. *Rev Med Int* 2008;29 suppl 3 : S318

S. Georgin-Lavialle, F. Suarez, Y. Lepelletier, F. Feger, L. Lhermitte, D. Canioni, P. Dubreuil, O. Hermine. Efficacité d'un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase dans une forme agressive de mastocytose (la leucémie à mastocytes) et identification d'une nouvelle mutation du gène *CKIT*. 59^{ème} congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Ajaccio, 4-6 juin 2009. *Rev Med Int* 2009;30 suppl 2 : S54.

S Georgin-Lavialle, L Lhermitte, C Grandpeix-Guyodo, D Canioni, S Barete, N Brousse, O Lortholary, E Mc Intyre, P Dubreuil, Y Lepelletier, V Asnafi, O Hermine. « Peut-on remplacer la biopsie ostéomédullaire par un myélogramme avec phénotypage pour établir le diagnostic de mastocytose systémique avec atteinte médullaire? Résultats de l'étude de 24 patients ». 60^{ème} congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Toulouse, 9-12 décembre 2009. *Rev Med Int* 2009;30 suppl4 :S361.

H Sokol, D Canioni, S Barete, **S Georgin-Lavialle**, C Grandpeix-Guyodo, P Dubreuil, O Lortholary, O Hermine. « Manifestations gastro-intestinales au cours de la mastocytose ». 60^{ème} congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Toulouse, 9-12 décembre 2009. *Rev Med Int* 2009;30 suppl 4 : S361-2.

Communications affichées :

C Aguilar , R Guieze, **S Georgin-Lavialle**, C Grandpeix-Guyodo, S Fraitag, D Canioni, N Brousse, O Lortholary, P Gaulard, P Dubreuil, O Tournilhac, O Hermine. Le sarcome mastocytaire, une entité rare et très agressive : Analyse des 6 cas de la littérature et description de 2 nouveaux cas. Congrès de la Société Française d'Hématologie, Paris, 18-20 mars 2010. *Hématologie*, 2010 ; volume 16.

S Georgin-Lavialle, F Suarez, S Letard, Y Lepelletier, Y Yang, K Hanssens, L Lhermitte, C Brouze, F Feger, D Canioni, P Dubreuil, O Hermine. Efficacité d'un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase dans une leucémie à mastocytes et identification d'une nouvelle mutation du gène *c-Kit*. Congrès de la Société Française d'Hématologie, Paris, 18-20 mars 2010. *Hématologie*, 2010 ; volume 16.

Articles scientifiques

Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D⁸¹⁶V and other activating c-Kit mutations.

Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal P, Hadj-Rabia S, Yang Y, Nasca L, Cohen-Akenine A, Barete S, Feger F, Arock M, Catteau B, **Georgin-Lavialle S**, Sans B, Stalder J-F, Skowron F, Thomas L, Lorette G, Plantin P, Bordigoni P, Lortholary O, de Prost Y, Sobol H, Moussy A and Dubreuil P.

J Invest Dermatol. 2010 Mar;130(3):804-15.

Introduction : La mastocytose de l'adulte est une maladie clonale associée à des mutations du gène *c-Kit*. En revanche, la mastocytose pédiatrique a la particularité de régresser spontanément, rendant incertain le rôle des mutations de *c-Kit*. Les études précédemment réalisées au cours des formes pédiatriques de mastocytose ont concerné uniquement de faibles populations et étaient principalement axées sur la mutation D816V de *c-Kit*.

Méthodologie : Dans ce travail, les biopsies cutanées de 50 enfants âgés de 0 à 16 ans et atteints de mastocytose ont été collectées. Les données cliniques étaient disponibles pour tous les patients. L'ARN a été extrait des biopsies de peau et du cDNA synthétisé afin d'analyser pour chaque sujet la séquence entière du gène *c-kit*.

Résultats : Une mutation du codon 816 situé dans l'exon 17 de *c-Kit* a été trouvée dans 42 % des cas, tandis que les mutations à l'extérieur de l'exon 17 ont été observées dans 44 % des cas. De façon inattendue, la moitié des mutations se trouvait dans la cinquième boucle immunoglobuline du domaine extracellulaire de c-Kit, qui est codée par exons 8 et 9. Toutes les mutations identifiées dans cette étude étaient somatiques et entraînaient une activation constitutive de c-Kit.

Conclusions, perspectives: Aucune corrélation phénotype-génotype claire n'a pu être mise en évidence, ni de relation claire entre les mutations et les formes familiales versus spontanées de la maladie. Ces résultats appuient fortement l'idée que les mastocytoses pédiatriques sont des maladies clonales associées à des mutations de *c-Kit*, bien qu'elles puissent régresser spontanément.

Pediatric Mastocytosis Is a Clonal Disease Associated with D⁸¹⁶V and Other Activating c-*KIT* Mutations

Christine Bodemer^{1,2,3}, Olivier Hermine^{2,4,5}, Fabienne Palmérini^{2,6,7}, Ying Yang⁷, Catherine Grandpeix-Guyodo², Phillip S. Leventhal⁸, Smail Hadj-Rabia^{1,3}, Laurent Nasca^{6,7}, Sophie Georgin-Lavialle^{2,4}, Annick Cohen-Akenine⁸, Jean-Marie Launay⁹, Stéphane Barete^{2,4}, Frédéric Feger⁴, Michel Arock⁴, Benoît Catteau¹⁰, Beatrix Sans¹¹, Jean François Stalder¹², François Skowron¹³, Luc Thomas¹⁴, Gérard Lorette¹⁵, Patrice Plantin¹⁶, Pierre Bordigoni¹⁷, Olivier Lortholary^{2,3,18}, Yves de Prost^{1,3}, Alain Moussy⁸, Hagay Sobol^{6,19,20} and Patrice Dubreuil^{6,7}

Adult mastocytosis is an incurable clonal disease associated with c-*KIT* mutations, mostly in exon 17 (D⁸¹⁶V). In contrast, pediatric mastocytosis often spontaneously regresses and is considered a reactive disease. Previous studies on childhood mastocytosis assessed only a few patients and focused primarily on codon 816 mutations, with various results. In this study, we analyzed the entire c-*KIT* sequence from cutaneous biopsies of 50 children with mastocytosis (ages 0–16 years). A mutation of codon 816 (exon 17) was found in 42% of cases, and mutations outside exon 17 were observed in 44%. Unexpectedly, half of the mutations were located in the fifth Ig loop of c-*KIT*'s extracellular domain, which is encoded by exons 8 and 9. All mutations identified in this study were somatic and caused a constitutive activation of c-*KIT*. There was no clear phenotype-genotype correlation, no clear relationship between the mutations and familial versus spontaneous disease, and no significant change in the relative expression of the c-*KIT* GNNK+ and GNNK isoforms. These findings strongly support the idea that, although pediatric mastocytosis can spontaneously regress, it is a clonal disease most commonly associated with activating mutations in c-*KIT*.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 29 October 2009; doi:10.1038/jid.2009.281

¹Service de Dermatologie, Hôpital Necker, Paris, France; ²CEREMAST, Centre de Référence des Mastocytoses, Faculté Necker, Paris, France; ³Université René Descartes Paris V, Paris, France; ⁴CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Université Paris V, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁵Service d'Hématologie Adulte, Hôpital Necker, Paris, France; ⁶Département d'Oncologie Génétique, Prévention et Dépistage, Institut Paoli Calmettes, Université Méditerranée, Marseille, France; ⁷INSERM U891, Laboratoire d'Hématopoïèse Moléculaire et Fonctionnelle, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France; ⁸AFIRMM (Association Française pour les Initiatives de Recherche sur le Mastocyte et les Mastocytoses), Paris, France; ⁹Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, Paris, France; ¹⁰Service de Dermatologie, Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille, Lille, France; ¹¹Service de Dermatologie, Vénérologie et Allergologie Hôpital Purpan, Toulouse, France; ¹²Service de Dermatologie, Hôpital Hôtel Dieu CHU de Nantes, Nantes, France; ¹³Service de Dermatologie, Centre Hospitalier de Valence, Valence, France; ¹⁴Service de Dermatologie, Hôpital Hôtel Dieu, Lyon, France; ¹⁵Service de Dermatologie CHU Trousseau, Tours, France; ¹⁶Service de Dermatologie, Hôpital Laënnec, Paris, France; ¹⁷Département d'Hématologie-Oncologie Hôpitaux Braboïs, Vandœuvre, France; ¹⁸Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹⁹INSERM CIC-P 9502, Marseille, France and ²⁰Université d'Aix-Marseille II, Marseille, France

Correspondence: Dr Christine Bodemer, Service de Dermatologie, Hôpital Necker, Université Paris V, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. E-mail: christine.bodemer@nck.aphp.fr or Professor Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Université Paris V, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France. E-mail: ohermine@gmail.com

Abbreviations: GIST, gastrointestinal stromal tumor; ITD, internal tandem duplication; SCF, stem cell factor; WT, wild type

Received 10 May 2009; revised 10 July 2009; accepted 10 July 2009

INTRODUCTION

Mastocytosis is a heterogeneous group of clinical disorders characterized by the abnormal accumulation of mast cells in various tissues, especially in the skin and hematopoietic organs (Valent *et al.*, 2003b; Akin and Metcalfe, 2004). Mastocytosis usually appears in infancy or early adulthood. In most pediatric cases, the disease is limited to the skin, but it can be associated with systemic symptoms due to the release of mediators from mast cells, even when there is no systemic infiltration. The typical presentation of childhood-onset mastocytosis includes cutaneous manifestations (that is, mastocytoma, urticaria pigmentosa, and, less commonly, diffuse cutaneous mastocytosis), and it usually has a good prognosis, with substantial improvement or spontaneous resolution before puberty (Kiszewski *et al.*, 2004; Ben-Amitai *et al.*, 2005). In a few cases, particularly in the neonatal diffuse cutaneous form, the disease can be fatal as a result of hypovolemic shock, although infrequent, systemic forms can occur in children. In these cases, the disease may remain active through adolescence as a systemic adult mastocytosis. Clinical or biological factors that predict the evolution and severity of the disease in affected children have not yet been identified.

In contrast to childhood-onset mastocytosis, adult-onset mastocytosis often persists for the lifetime of the patient. Adult-onset mastocytosis is also more likely to be a severe

and systemic disease involving numerous organs. In some cases, it is associated with a clonal hematologic non-mast-cell lineage disease, such as a myelodysplastic or myeloproliferative disorder. Adult-onset mastocytosis can also lead to the rare mast cell leukemia, which carries a high risk of mortality (Valent *et al.*, 2003a).

It has now been clearly demonstrated that adult mastocytosis is related to the clonal proliferation of mast cells secondary to a gain of function of the proto-oncogene c-KIT (Longley *et al.*, 1996, 1999). Thus, in most cases adult mastocytosis is now considered a clonal myeloproliferative disorder. The c-KIT gene encodes a type III transmembrane tyrosine kinase that is the receptor for stem cell factor (SCF) (Broudy, 1997). The protein possesses an extracellular ligand-binding domain composed of five Ig-like regions, followed by a transmembrane domain, a negative regulatory juxtamembrane intracellular domain, and a cytoplasmic protein tyrosine kinase domain split by an insert into adenosine triphosphate-binding and phosphotransferase regions (Yarden *et al.*, 1987; Qiu *et al.*, 1988). The two KIT isoforms differ in the presence or absence of four amino acids (GNNK) in the juxtamembrane region of the extracellular domain. Importantly, tyrosine autophosphorylation of the GNNK isoform is more rapid and gives rise to greater phosphorylation and activation of MAP kinase than is seen with the GNNK+ form. Ordinarily, the GNNK- form predominates (Caruana *et al.*, 1999). A variety of mutations have been found in c-KIT. Although it is not clear how heterogeneity in c-KIT mutations is involved in adult mastocytosis, it might account for the diversity of clinical presentations. Most patients with adult-onset mastocytosis have been reported to have the D⁸¹⁶V mutation. The V⁵⁶⁰G mutation is also found but is less frequent. Both the D⁸¹⁶V and the V⁵⁶⁰G mutations constitutively activate c-KIT, resulting in the clonal proliferation of mast cells (Longley *et al.*, 2001). Constitutively activated KIT is involved in other proliferative disorders, such as in gastrointestinal stromal tumors (GISTs), in which imatinib mesylate was found to be effective. In GISTs, most of the c-KIT mutations lie within the juxtamembrane intracellular domain. The location of the mutation is important in that the presence of a mutation in the phosphotransferase domain (D⁸¹⁶V mutation) confers a spontaneous resistance to imatinib mesylate as in most of adult-onset mastocytosis.

The frequency and role of c-KIT mutations in childhood-onset mastocytosis and whether it is a clonal disease remain a matter of debate. A study by Longley *et al.* (1996) of six typical pediatric mastocytosis patients found that all lacked mutations in codon 816 but that three of the six had a dominant inactivating mutation, K⁸³⁹E. Similarly, Buttner *et al.* (1998) reported that of 11 patients with childhood-onset mastocytosis, none had codon 816 mutations, suggesting that childhood mastocytosis is a reactive rather than a clonal disease. In contrast, in more recent studies, Yanagihori *et al.* (2005) found missense mutations in codon 816 in 10 of 12 Japanese children with mastocytosis, and Verzijl *et al.* (2007) found that 25% of children with urticaria pigmentosa had the D⁸¹⁶V mutation.

Thus, most of the studies on the role of c-KIT mutations in childhood mastocytosis have focused on codon 816 and included relatively few patients. In this study, we screened the entire coding sequence of c-KIT mRNA from cutaneous lesions of 50 children between 0 and 16 years of age with sporadic or familial mastocytosis. Overall, 86% of the patients had mutations in c-KIT. The D⁸¹⁶V mutation was present in 35% of the children, including two of four children with a familial form of the disease. We also found two patients with a D⁸¹⁶Y mutation and one with a D⁸¹⁶I mutation. Importantly, 44% of the children had mutations in exons 8, 9, and 11 that were mutually exclusive of the codon 816 mutations. All the detected mutations activated the c-KIT tyrosine kinase. Finally, we did not find any clear phenotype-genotype correlations, any notable differences in the relative expression of c-KIT GNNK isoforms, or a clear relationship between the genotype and familial versus sporadic forms of the disease. These findings indicate that, despite the high rate of spontaneous regression, childhood mastocytosis is most often a clonal disease associated with activating mutations in c-KIT.

RESULTS

Clinical characteristics of patients

We performed a multicenter study to examine the association of c-KIT mutations with childhood-onset mastocytosis. The study included 65 patients with childhood-onset mastocytosis. The mean age was 7.0 ± 4.7 years. A case report form was completed for 54 of the 65 patients, and mutation screening was performed in 50 cases. The total population consisted of 38 (58%) males and 27 (42%) females, with an equal distribution of the different forms of mastocytosis in males and females. The type of skin lesion was urticaria pigmentosa in 80% of the patients, mastocytoma in 11%, and diffuse cutaneous mastocytosis in 9%. In 13% of cases, another member of the family also suffered from mastocytosis. Lesions appeared before 2 years of age in 85% of the patients, between 3 and 9 years in 13%, and around 14 years of age in the remaining 12%. The overall mean age of onset was 3.0 ± 3.5 years. The serum tryptase levels determined in 17 cases were within the normal range ($<15 \mu\text{g l}^{-1}$) (Table 1). A bone marrow biopsy was collected from only one case (patient M099) (Table 1). Our ethics committee prohibited the collection of blood or additional biopsy samples from the patients except when necessary for therapeutic decisions. It was possible to collect a bone marrow biopsy from patient M099 because, being 16 years old at the time of analysis, he was considered an adult patient in France. This patient had shown diffuse cutaneous involvement since birth, along with severe systemic manifestations, hepatomegaly, splenomegaly, and adenopathy. Histological analysis of the bone marrow biopsy showed infiltration by pathological mast cells ($>10\%$), confirming systemic disease.

Analysis of c-KIT codon 816

The D⁸¹⁶V mutation of c-KIT, which lies within and activates the kinase domain, is frequently associated with adult mastocytosis (Longley *et al.*, 2001). One previous study of children with mastocytosis did not find this mutation (Longley

Table 1. Summary of patient characteristics and c-KIT mutation status

No.	Sex	Type of skin lesion	Age at onset	Age at biopsy	Serum tryptase (ng ml ⁻¹)	Familial case	c-KIT sequence-RNA ¹			c-KIT sequence-DNA ²
							Mutation	Exon	Exon 10 sequence	
E001	M	UP	1 week	3 years	3.2	No	D ⁸¹⁶ V	17	M ⁵⁴¹ L	ND
E015	M	UP	9 months	3 years	4.9	No	D ⁸¹⁶ V	17	M ⁵⁴¹ L	ND
E033	M	UP	2 months	10 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	M ⁵⁴¹ L	ND
E047	F	UP	2 months	2 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	M ⁵⁴¹ L	ND
E009	F	UP	Birth	10 years	5	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E012	F	UP	Birth	3 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E024	M	UP	Birth	4 years	14.3	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E025	F	UP	1 month	3 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	WT
E027	F	UP	2 years	7 years	3.4	Yes	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E031	F	UP	9 months	9 years	6.1	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	WT
E034	M	UP	3 months	11 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	WT
E035	F	UP	16 years	18 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	WT
E036	M	UP	4 months	2 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E049	M	UP	4 months	2 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E004	M	DCM	3 months	7 years	5.9	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
M081	M	NA	Birth	3 years	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
M084	M	NA	Birth	9 years	ND	Yes	D ⁸¹⁶ V	17	WT	WT
E006	M	NA	NA	NA	ND	No	D ⁸¹⁶ V	17	WT	ND
E018	M	UP	5 weeks	5 years	ND	No	D ⁸¹⁶ Y	17	M ⁵⁴¹ L	WT
M099	M	DCM ³	Birth	16 years	ND	No	D ⁸¹⁶ Y	17	WT	ND
E010	M	DCM	Birth	7 years	2.7	No	D ⁸¹⁶ I	17	WT	ND
E005	M	UP	Birth	2 years	4	No	InsFF ⁴¹⁹	8	M ⁵⁴¹ L	WT
E008	F	UP	4 months	8 years	1.4	No	Δ ⁴¹⁹	8	M ⁵⁴¹ L	ND
E050	F	UP	4 months	5 months	ND	No	Δ ⁴¹⁹	8	M ⁵⁴¹ L	ND
E022	F	UP	2 months	2 years	4.5	No	Δ ⁴¹⁹	8	WT	ND
E038	M	UP	5 months	6 years	ND	No	Δ ⁴¹⁹	8	WT	WT
E030	M	DCM	2 months	3 years	7.2	No	Δ ⁴¹⁹	8	M ⁵⁴¹ L	ND
E026	F	NA	Birth	9 years	10	No	Δ ⁴¹⁹	8	M ⁵⁴¹ L	WT
E061	F	NA	Birth	1 year	ND	No	Δ ⁴¹⁹	8	WT	WT
E011	F	MC	Birth	4 years	ND	No	Δ ⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ InsY	8	WT	ND
E017	M	MC/UP	3 months/12 months ⁴	6 years	ND	No	C ⁴⁴³ Y	8	WT	WT
E032	F	UP	4 m	5 years	ND	No	S ⁴⁷⁶ I	9	WT	ND
E054	M	NA	NA	NA	ND	No	ITD ⁵⁰¹⁻⁵⁰²	9	M ⁵⁴¹ L	ND
E013	M	UP	1 year	10 years	ND	No	ITD ⁵⁰¹⁻⁵⁰²	9	M ⁵⁴¹ L	WT
E002	M	UP	Birth	1 year	ND	No	ITD ⁵⁰²⁻⁵⁰³	9	WT	ND
E020	M	DCM	1 year	5 years	7.1	No	ITD ⁵⁰²⁻⁵⁰³	9	WT	ND
E041	F	MC	2 months	3 years	ND	No	ITD ⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁸	9	WT	ND
E007	M	UP	7 years	9 years	4.6	No	K ⁵⁰⁹ I	9	M ⁵⁴¹ L	ND
E014	F	UP	3 months	1 year	3.9	No	K ⁵⁰⁹ I	9	WT	WT
E040	F	UP	1 year	2 years	ND	No	K ⁵⁰⁹ I	9	WT	ND
E044	M	UP	10 months	2 years	ND	No	K ⁵⁰⁹ I	9	WT	ND
E053	F	UP	3 months	2 years	ND	No	K ⁵⁰⁹ I	9	WT	ND

Table 1 continued on the following page

Table 1. Continued

No.	Sex	Type of skin lesion	Age at onset	Age at biopsy	Serum tryptase (ng ml ⁻¹)	Familial case	c-KIT sequence-RNA ¹			c-KIT sequence-DNA ²
							Mutation	Exon	Exon 10 sequence	
E003	M	NA	3 years	10 years	ND	No	D ⁵⁷² A	11	M ⁵⁴¹ L	ND
E037	M	UP	4 years	12 years	ND	No	WT	—	WT	ND
E042	M	UP	3 years	13 years	ND	No	WT	—	WT	ND
E043	F	UP	3 years	4 years	ND	Yes	WT	—	WT	ND
E060	F	MC	Birth	3 years	ND	No	WT	—	WT	ND
E048	M	NA	Birth	1 years	ND	No	WT	—	WT	ND
M123	M	NA	2 years	8 years	ND	Yes	WT	—	WT	ND
M216	F	NA	3 years	11 years	ND	No	WT	—	WT	ND

DCM, diffuse cutaneous mastocytosis; F, female, M, male; MC, mastocytoma; UP, urticaria pigmentosa; WT, wild type.

¹The presence of mutations was assessed by reverse transcription-PCR using RNA isolated from skin biopsies, and the mutations are detailed in Table 2.

²The presence of mutations was assessed by PCR using DNA isolated from blood samples.

³Patient diagnosed with systemic mastocytosis as indicated by bone marrow and liver involvement.

⁴Patient 017 was first diagnosed with a mastocytoma at 3 months and then with UP at 12 months.

The table includes the 50 patients on whom mutation screening was carried out.

ND indicates not done (that is, blood sample was not available); NA, skin involvement unknown because the case report form was not available.

et al., 1996; Buttner *et al.*, 1998), although one study found this mutation in 7% (Longley *et al.*, 1999), another found it in 25% (Verzijl *et al.*, 2007) of patients, and a third found it in 64.3% (Yanagihori *et al.*, 2005). Therefore, we first examined the frequency of this mutation in our panel of children with mastocytosis. We found that 29 of the 50 children (58%) had the wild-type sequence (Asp) at codon 816 (Figure 1 and Table 1). Eighteen (36%) of the remaining children had the D⁸¹⁶V mutation, and two (4%) had a D⁸¹⁶Y mutation, including the patient diagnosed with systemic mastocytosis. Also, one patient (2%) had a previously undescribed D⁸¹⁶I mutation. We did not have sequence data from bone marrow because the collection of bone marrow biopsies from the children in this study was prohibited by our ethical committee, except when necessary for therapeutic decisions. Importantly, bone marrow samples were not needed because analysis of the cutaneous biopsies was sensitive enough to detect the mutations.

We next carried out restriction-length polymorphism analysis to confirm the presence or absence of mutations at codon 816. The cDNAs generated from the cutaneous biopsy samples were amplified by PCR using fluorescent primers, and the resulting amplicons were digested with *PleI* or *BsmA1*, which specifically cut the D⁸¹⁶V-containing sequence and the wild-type sequence, respectively. This method was sensitive enough to detect the mutated allele when it was present in as few as approximately 2% of the cells in the sample. The results of this analysis confirmed the presence or absence of the mutations that had been identified by sequencing (data not shown).

Identification of mutations in other codons

Because a substantial portion of our patient population (58%) lacked changes in codon 816, we investigated whether they

had mutations at other sites in c-KIT or whether the technique was not sufficiently sensitive to detect the D⁸¹⁶V mutation in these cases. We therefore sequenced the entire c-KIT coding region for all patients lacking the D⁸¹⁶V mutation. Five PCR fragments were amplified covering the entire c-KIT-coding sequence: nucleotides 1–792 (exons 1–4), 729–1288 (exons 4–7/8), 1197–2121 (exons 7–14), 1934–2517 (exons 13–17/18), and 2413–2991 (exons 17–21) (Figure 1). Direct sequencing of these PCR amplicons was carried out for each patient sample, and identified mutations were confirmed by performing a new reverse transcription reaction.

Using this method, we identified several new mutations in c-KIT in our patient population. These alterations were mainly located in exons 8 and 9. The mutations in exon 8 included an insertion of FF at codon 419 (InsFF⁴¹⁹, one case (2%)), a single deletion of D⁴¹⁹ (Δ⁴¹⁹, eight cases (16%)), a 2-bp deletion with a 1-bp substitution between codons 417 and 419 (Δ^{417–418}D⁴¹⁹Y, one case (2%)), and a substitution of a cysteine at codon 443 with a tyrosine (C⁴⁴³Y, one case (2%)) (Tables 1 and 2 and Figure 1). In exon 9, there was a substitution of a serine at codon 476 with an isoleucine (S⁴⁷⁶I, one case (2%)), an internal tandem duplication of the A⁵⁰²Y⁵⁰³ pair (ITD^{502–503}, two cases (4%)), and two other internal tandem duplications leading to insertions near these two residues at codons 501 and 505 (ITD^{501–502} and ITD^{505–508}, three cases (6%)). In addition, we identified five cases (10%) that had K⁵⁰⁹I substitutions. The C⁴⁴³Y and S⁴⁷⁶I mutations are new substitutions that lie nearby and between hot spots at codons 417–419 and 501–509. Furthermore, in 14 patients (28%), we found a single type of substitution at codon 541 (M⁵⁴¹L), which lies in exon 10. This KIT polymorphism was reported in mastocytosis and in the normal population and seems to enhance the response to only low levels of SCF (Foster *et al.*, 2008). Interestingly, none

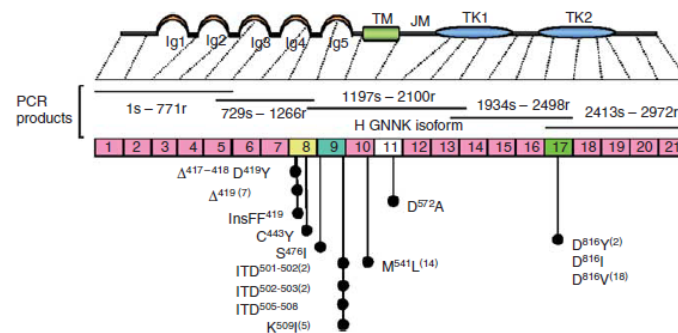


Figure 1. Summary of *c-KIT* mutations found in the patients with childhood mastocytosis. Schematic diagram of the KIT receptor protein and the corresponding location of the 21-exon coding sequence. The exon numbers are shown in boxes, and specific mutations are indicated in the corresponding regions. The numbers of identical mutations found in this study appear in parentheses. Also shown is a schematic map of PCR products (primers used are listed in Supplementary Table 1). The position of GNNK+ isoform is indicated at the end of exon 9. Ig, Ig loop-like domain; JM, juxtamembrane intracellular domain; TK1 and TK2, tyrosine kinase domain regions 1 and 2, respectively; TM, transmembrane domain.

Table 2. Summary of *c-KIT* mutations found in this study

Mutation	Nucleotide sequence (5' → 3') ¹	Position ²	Changes in amino acid sequence
D ⁸¹⁶ V	agagTcatc	2247	Asp ⁸¹⁶ to Val
D ⁸¹⁶ Y	agaTcatc	2446	Asp ⁸¹⁶ to Tyr
D ⁸¹⁶ I	agaATcatc	2446	Asp ⁸¹⁶ to Ile
InsFF ⁴¹⁹	acttacTTCTTCgac agg	1255	Insertion of PhePhe at amino acid 419
Δ ⁴¹⁷⁻⁴¹⁸ InsY	gaaatcctg — Tacaggctc	1249	Replacement of Thr ⁴¹⁷ Tyr ⁴¹⁸ Asp ⁴¹⁹ with Tyr
Δ ⁴¹⁹	acttac — aggcctc	1255	Deletion of Asp ⁴¹⁹
C ⁴⁴³ Y	ttttAtcca	1328	Cys ⁴⁴³ to Tyr
S ⁴⁷⁶ I	cagaTttct	1427	Ser ⁴⁷⁶ to Ile
ITD ⁵⁰¹⁻⁵⁰²	actctgcTTCTGcctatttt	1500	Duplication of Ser ⁵⁰¹ Ala
ITD ⁵⁰¹⁻⁵⁰²	actctgcctCTGcCtatttt	1502	Duplication of Ser ⁵⁰¹ Ala
ITD ⁵⁰²⁻⁵⁰³	tctgcctatGCCTATtttaac	1504	Duplication of Ala ⁵⁰² Tyr
ITD ⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁸	tattttaactttgcatttAACTTTGCATTaaagag	1525	Duplication of Asn ⁵⁰⁵ PheAlaPhe
K ⁵⁰⁹ I	tttaTagag	1526	Lys ⁵⁰⁹ to Ile
D ⁵⁷² A	atagCccca	1715	Asp ⁵⁷² to Ala
M ⁵⁴¹ L	gtgCtgatt	1621	Met ⁵⁴¹ to Leu

¹Altered sequences are indicated in capital letters.

²Nucleotide positions are indicated according to the *c-KIT* sequence in GenBank (accession number X06182).

of the patients with the wild-type codon 816 sequence (aspartate) carried the M⁵⁴¹L substitution. To assess whether the M541L mutation was located on the same allele as the *c-KIT* D816V mutation, we further genotyped 11 of 14 M541L-positive patients. We found no difference in the frequency of expression of M541L in the allele bearing the activating mutations (5 of 11) versus that in the wild-type allele (6 of 11). We did not find clinical differences between both groups, but one child among the five of the former group had diffuse cutaneous mastocytosis. Eventually, we performed sequence analysis for the entire *c-KIT* coding region for all patients. Surprisingly, all the newly identified muta-

tions were mutually exclusive of mutations in codon 816 (data not shown). Overall, 43 of the 50 patients (86%) in this study had mutations in *c-KIT*.

Analysis of genomic DNA for *c-KIT* mutations

Blood samples were available for 13 patients, making it possible to analyze genomic DNA for the presence of *c-KIT* mutations. One of these 13 samples was from a patient (M084) with a familial form of mastocytosis. Mutations in *c-KIT* were not found in any of these samples (Table 1), indicating that in these cases the mutations were somatic rather than germline.

Effect of mutations on KIT activity in Cos cells

Activation of KIT by the D^{816V} mutation is frequently found in adult mastocytosis (Buttner *et al.*, 1998). We therefore examined whether the mutations identified in this study also caused ligand-independent activation of KIT. Cos cells were transiently transfected with plasmids expressing wild-type KIT or KIT containing the $\Delta^{417-418}$ D^{419Y}, C^{443Y}, S^{476I}, ITD⁵⁰²⁻⁵⁰³, K^{509I}, D^{572A}, D^{816V}, D^{816Y}, or D^{816I} mutation. After treatment of cells with or without 250 ng ml⁻¹ SCF, the tyrosine phosphorylation of KIT was assessed by western blotting. As shown in Figure 2, SCF stimulated the tyrosine phosphorylation of wild-type KIT, and, as expected, the D^{816V} mutation constitutively activated KIT tyrosine phosphorylation. Importantly, all the other tested mutations resulted in a ligand-independent tyrosine phosphorylation of KIT (Supplementary Figure 1), except for the M541L variant (Supplementary Figure 2).

Expression ratio of the GNNK+ and GNNK- isoforms in patients
The GNNK- (short (S)) and GNNK+ (long (L)) isoforms of KIT have been shown to signal through different pathways and to have distinct transforming activities (Caruana *et al.*, 1999); moreover, deregulation of the expression ratio of these

isoforms may participate in mastocytosis. Therefore, we examined the expression ratio of the GNNK- and GNNK+ isoforms (S/L ratio). This analysis was performed for 47 patients. In cases in which patients had an insertion or deletion mutation, both short and long wild-type and mutant isoforms could be detected, allowing a direct assessment of the effect of the mutation on mRNA splicing. There was little or no difference in the S/L ratios for the wild-type or mutant-length isoforms for these patients (Table 3). It was not possible to calculate the S/L ratios for patient E041, who had a 12-nucleotide ITD that caused the short mutated isoform to be the same length as the wild-type long form. For patients with point mutations in c-KIT, the lengths of the isoforms were the same as those of the wild type. The mean S/L ratio for the entire population was 10.8 ± 2.8 ($n=47$), and the S/L ratio for patients with an insertion or deletion mutant of c-KIT was not significantly different for patients with wild-type KIT (9.1 ± 3.8 ($n=13$) vs. 10.2 ± 3.4 ($n=7$)).

Genotype-phenotype correlation and comparison of familial versus sporadic cases

Analysis of genotype-phenotype relationships was possible in 44 cases (Table 4). There was no clear correlation between the phenotypes (cutaneous involvement) and the genotypes of the patients, except for an absence of mutations in codon 816 in children whose mastocytosis occurred between the ages of 3 and 16 years (data not shown). Also, for 48 cases, we had information on whether the disease was familial or sporadic. Again, there was no clear correlation between the genotype and familial versus sporadic disease, except for an absence of exon 8, 9, and 11 mutations in patients with a familial form of the disease. Meaningful statistical analysis by phenotype or familial versus sporadic disease was not possible because of insufficient numbers of patients in several of the categories. In addition, none of the patients had an aggressive form or a tryptase level above $200 \mu\text{g l}^{-1}$.

DISCUSSION

We performed a multicenter study to examine the association of c-KIT mutations with childhood-onset mastocytosis. Sequencing of c-KIT was performed in 50 children between 0 and 16 years of age. This was the largest study of mutations in childhood-onset mastocytosis to date.

We found the D^{816V} mutation (exon 17), which is frequently associated with adult mastocytosis (Longley *et al.*, 2001), in 18 of 50 (36%) children in this study. Three additional patients (6%) had other mutations in codon 816, including two with a D^{816Y} mutation and one with a previously unreported D^{816I} mutation. As with the D^{816V} mutation, we found that both the D^{816Y} and D^{816I} mutations cause a ligand-independent activation of KIT.

We also identified several genetic alterations in c-KIT in our patient population, some of which have not previously been identified in childhood or adult mastocytosis. These alterations were located mainly in exons 8 and 9 (22 of 50 patients (44%); Figure 1), which encode the fifth Ig (D5) domain and the extracellular region near the transmembrane domain, regions that have previously been shown to be

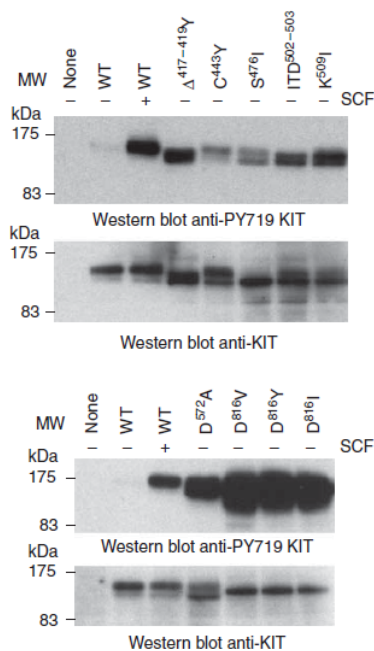


Figure 2. Ligand-independent autophosphorylation of KIT. Cos cells were transiently transfected with pcDNA plasmids for expressing wild type or mutants of KIT and treated with (+) or without (–) 250 ng ml⁻¹ stem cell factor (SCF). Western blotting was carried out using an antibody against KIT phosphorylated on Tyr⁷¹⁹ (anti-PY719 KIT) or with an anti-c-KIT antibody (anti-KIT).

Table 3. Expression of GNNK isoforms and S/L ratios

Patient	Genotype	Area under the curve				S/L ratio	
		Wild-type size		Mutated size		Wild-type size	Mutated size
		GNNK–	GNNK+	GNNK–	GNNK+		
E001	D ⁸¹⁶ V	69795	5507	0	0	13	NA
E015	D ⁸¹⁶ V	66707	7841	0	0	9	NA
E033	D ⁸¹⁶ V	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E047	D ⁸¹⁶ V	66526	5973	0	0	11	NA
E009	D ⁸¹⁶ V	67032	8706	0	0	8	NA
E012	D ⁸¹⁶ V	70751	8826	0	0	8	NA
E024	D ⁸¹⁶ V	69836	5905	0	0	12	NA
E025	D ⁸¹⁶ V	64939	4957	0	0	13	NA
E027	D ⁸¹⁶ V	69350	5509	0	0	13	NA
E031	D ⁸¹⁶ V	66869	4732	0	0	14	NA
E034	D ⁸¹⁶ V	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E035	D ⁸¹⁶ V	72160	5464	0	0	13	NA
E036	D ⁸¹⁶ V	69483	8044	0	0	9	NA
E049	D ⁸¹⁶ V	68531	5819	0	0	12	NA
E004	D ⁸¹⁶ V	68904	10487	0	0	7	NA
M081	D ⁸¹⁶ V	65330	5106	0	0	13	NA
M084	D ⁸¹⁶ V	60394	5212	0	0	12	NA
E006	D ⁸¹⁶ V	67922	5577	0	0	12	NA
E018	D ⁸¹⁶ V	66245	8212	0	0	8	NA
M099	D ⁸¹⁶ V	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E010	D ⁸¹⁶ I	28780	1783	0	0	16	NA
E005	InsFF ⁴¹⁹	10664	1688	8040	1202	6	7
E008	Δ ⁴¹⁹	13733	1016	12833	943	14	14
E050	Δ ⁴¹⁹	14727	1089	12829	979	14	13
E022	Δ ⁴¹⁹	13266	1803	12213	1717	7	7
E038	Δ ⁴¹⁹	67019	7748	57624	7192	9	8
E030	Δ ⁴¹⁹	14429	1762	11259	1416	8	8
E026	Δ ⁴¹⁹	59224	7741	21743	2692	8	8
E061	Δ ⁴¹⁹	12045	1484	12434	1575	8	8
E011	Δ ^{417–419} InsY	62184	4197	67474	4863	15	14
E017	C ⁴⁴³ Y	66178	5882	0	0	11	NA
E032	S ⁴⁷⁶ I	73569	6956	0	0	11	NA
E054	ITD ^{501–502}	14083	938	13226	1519	15	9
E013	ITD ^{501–502}	13469	1512	11147	1639	9	7
E002	ITD ^{502–503}	34023	3324	32606	2807	10	12
E020	ITD ^{502–503}	65419	4268	54359	3144	15	17
E041 ¹	ITD ^{505–508}	44131	30290	0	0	NC	NA
E007	K ⁵⁰⁹ I	63898	7419	0	0	9	NA
E014	K ⁵⁰⁹ I	50404	4751	0	0	11	NA
E040	K ⁵⁰⁹ I	23766	1954	0	0	12	NA
E044	K ⁵⁰⁹ I	66224	3909	0	0	17	NA
E053	K ⁵⁰⁹ I	65933	6508	0	0	10	NA

Table 3 continued on the following page

Table 3. Continued

Patient	Genotype	Area under the curve				S/L ratio	
		Wild-type size		Mutated size			
		GNNK–	GNNK+	GNNK–	GNNK+	Wild-type size	Mutated size
E003	D ⁵⁷² A	66258	7454	0	0	9	NA
E037	Wild type	24654	2719	0	0	9	NA
E042	Wild type	68563	10774	0	0	6	NA
E043	Wild type	68893	7190	0	0	10	NA
E060	Wild type	69413	4040	0	0	17	NA
E048	Wild type	50468	5672	0	0	9	NA
M123	Wild type	57655	9215	0	0	6	NA
M216	Wild type	62026	8657	0	0	7	NA

NA, not applicable; ND, not done.
¹NC, not calculable because the short mutated form contained a 12-nucleotide difference, so that it could not be distinguished from the wild-type long isoform allele.

Table 4. c-KIT mutations by phenotype

Mutation	All, n (%) (n=50)	Type of skin lesion			Familial vs sporadic	
		Urticaria pigmentosa, n (%) (n=31)	Diffuse cutaneous mastocytosis, n (%) (n=4)	Mastocytoma, n (%) (n=2)	Familial, n (%) (n=4)	Sporadic, n (%) (n=44)
D ⁸¹⁶ V	18 (36)	14 (45)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	15 (34)
Any codon 816	21 (42)	15 (48)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	18 (41)
Exons 8, 9, or 11	22 (44)	13 (42)	2 (50)	2 (100)	0 (0)	21 (48)
Any mutation	43 (86)	28 (90)	4 (100)	2 (100)	2 (50)	39 (89)
None (wild type)	7 (14)	3 (10)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	5 (11)

affected in core-binding factor-acute myeloid leukemia and in GISTs, respectively (Gari *et al.*, 1999; Lux *et al.*, 2000). Interestingly, alterations in these two exons have been only rarely found in pediatric or adult forms of mastocytosis. The mutations in exon 8 included an insertion of FF (InsFF⁴¹⁹) and a single deletion at D⁴¹⁹ (Δ^{419}), as well as a 2-bp deletion with a 1-bp substitution in the same area ($\Delta^{417-418}$ D⁴¹⁹Y). The latter insertion has been reported in core-binding factor-acute myeloid leukemia (Gari *et al.*, 1999; Goemans *et al.*, 2005), and the Δ^{419} mutation has been identified in kindreds with familial GISTs and mastocytosis (Hartmann *et al.*, 2005).

In exon 9, there was an internal tandem duplication of the A⁵⁰²Y⁵⁰³ pair, which has been described mainly in GISTs (Lux *et al.*, 2000), as well as insertions around these two residues at codons 501 and 505. In addition, we identified a substitution in codon 509 (K⁵⁰⁹I). This mutation was previously reported in three siblings with familial mastocytosis, but its effect on KIT activity was not examined (Zhang *et al.*, 2006). Although this is at the 3'-limit of exon 9, the relative ratio of GNNK+ to GNNK isoforms was unchanged by this mutation, indicating that it did not alter mRNA splicing. We also identified substitutions C⁴⁴³Y (exon 8) and S⁴⁷⁶I (exon 9) for the first time. According to these results, it seems that there are two hot spots for mutations in childhood-

onset mastocytosis at codons 417–419 and 501–509 (exons 8 and 9, respectively; Figure 1). Substitutions C⁴⁴³Y and S⁴⁷⁶I lie near and between these two hot spots.

Interestingly, all the tested mutations in exons 8 and 9 ($\Delta^{417-418}$ D⁴¹⁹Y, C⁴⁴³Y, S⁴⁷⁶I, and ITD⁵⁰²⁻⁵⁰³, and K⁵⁰⁹I) activated the tyrosine phosphorylation of KIT. Indeed, mutations at or near Asp⁴¹⁹ and Ala⁵⁰²–Tyr⁵⁰³ are known to activate KIT, and a very recent crystallographic study revealed that these residues lie at an interface between D5 domains in the ligand-induced dimers of KIT, suggesting that oncogenic mutations at these sites act by enhancing homotypic interactions between D5 domains (Yuzawa *et al.*, 2007). The activation of KIT by the C⁴⁴³Y mutation supports the idea that this residue is involved in the proper folding of the D5 domain (Broudy *et al.*, 2001), so that its mutation could also enhance the association of D5 domains. Although the importance of S⁴⁷⁶ is not currently clear, it could act in the same manner. Overall, these results strongly support the idea that residues 417–419 and 501–509 have key roles in KIT activation, and, furthermore, that they and other activating mutations in exons 8 and 9 are selectively involved in childhood-onset mastocytosis.

Surprisingly, we found only one substitution in exon 11 (D⁵⁷²A; patient E003). This residue is part of a peptide

sequence that includes Tyr⁵⁷⁰, which, when phosphorylated, binds several SH2-domain-containing proteins, such as the tyrosine phosphatases SHP1 and SHP2 (Kozlowski *et al.*, 1998), members of the Src family kinases (Lennartsson *et al.*, 1999), and SOCS6 (Bayle *et al.*, 2004). Thus, this amino acid could control the recognition of SH2 domains by KIT or regulate the autoinhibition of its tyrosine kinase activity (Ma *et al.*, 1999a; Mol *et al.*, 2004). Indeed, we found that, *in vitro*, this mutation activated KIT tyrosine phosphorylation. Several genetic alterations were reported in this peptide sequence in a large proportion of GISTs (Heinrich *et al.*, 2003a), as well as in dog mast cell tumors (Longley *et al.*, 1995), and it has been reported at the analogous site in other receptor tyrosine kinases, such as in FLT3 in acute myeloid leukemia (Gilliland and Griffin, 2002) and platelet-derived growth factor- α receptor in GISTs (Heinrich *et al.*, 2003b). Although the D⁵⁷²A mutation was found less frequently than the other c-KIT mutations, it also caused constitutive ligand-independent autophosphorylation of the KIT protein when expressed in Cos cells. Importantly, all the identified extracellular and juxtamembrane intracellular domain mutations are sensitive to imatinib, in contrast to the D⁸¹⁶ mutation (Y Yang *et al.*, unpublished data).

Interestingly, we did not detect mutations F⁵²²C, V⁵³⁰I, or A⁵³³D, which have been previously identified in mastocytosis patients and lie in the transmembrane domain of KIT (exon 10) (Akin *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004). Because each of these was reported in only a single patient, they could represent very rare events not appearing in our panel, or they may be specifically associated with familial and/or adult mastocytosis.

We found a single substitution at codon 541 (M⁵⁴¹L). This codon lies within exon 10, which encodes the transmembrane domain. The Met-to-Leu substitution is conservative, and because this mutation was previously reported in a normal population and in normal tissues (Nagata *et al.*, 1996), it is considered a polymorphic variation. In a recent article, germline M⁵⁴¹L mutations were reported in familial cases of pediatric mastocytosis. This mutation was shown to enhance SCF sensitivity slightly (Foster *et al.*, 2008). However, for one of our M⁵⁴¹L-expressing patients, a blood sample was available, allowing the analysis of genomic DNA. In this case, the substitution was not present in the genomic DNA, suggesting that this position may be highly affected by somatic variation, as previously reported in patients in the blast crisis of chronic myeloid leukemia (Inokuchi *et al.*, 2002). In addition, when ectopically expressed in murine Ba/F3 cells, KIT containing this mutation mediates cell proliferation to the same extent as the wild-type receptor, although the mutant seems to be slightly more sensitive to SCF than the wild-type receptor—but only to low levels of SCF, as previously reported (Foster *et al.*, 2008) (Supplementary Figure 2). This M⁵⁴¹L mutation could act by causing a slight change in the conformation of KIT, resulting in enhanced dimerization and autophosphorylation. In this way, the M⁵⁴¹L mutation could increase cell proliferation in chronic myeloid leukemia and thereby reduce the survival of these patients (Inokuchi *et al.*, 2002). In mastocytosis, this

hypersensitivity to SCF could increase the survival of M⁵⁴¹L-expressing mast cells, leading to mast cell accumulation. It is noteworthy that none of the patients with the wild-type codon 816 sequence (Asp) carried the M⁵⁴¹L substitution.

Importantly, all the tested mutations in codons 8, 9, 11, and 17 ($\Delta^{417-418}$ D⁴¹⁹Y, C⁴⁴³Y, S⁴⁷⁶I, ITD⁵⁰²⁻⁵⁰³, K⁵⁰⁹I, D⁵⁷²A, D⁸¹⁶V, D⁸¹⁶Y, and D⁸¹⁶I) caused a constitutive ligand-independent activation of KIT, with a higher phosphorylation status for exon 17 mutations (Figure 2). Combined with the fact that most (86%) of the patients had mutations in these codons, this strongly supports the idea that, like adult mastocytosis, childhood mastocytosis is a clonal disease. These findings further emphasize the importance of KIT activation in both pediatric and adult mastocytosis.

Yanagihori *et al.* (2005) recently described c-KIT mutations in 12 patients with childhood-onset mastocytosis. They reported that children with a D⁸¹⁶F mutation developed cutaneous mastocytosis at an earlier age than those with the D⁸¹⁶V mutation, although the statistical significance was very low ($P=0.068$). In contrast, in this study we did not find any obvious genotype-phenotype correlations, except for an absence of mutations in codon 816 in children with an onset of mastocytosis between 3 and 16 years of age. We also did not find the D⁸¹⁶F mutation in our panel of children with mastocytosis. The difference between our findings and those of Yanagihori *et al.* (2005) may be due to the facts that all of their patients were of different genetic backgrounds and that we included a larger number of patients (50 vs 12) in our study.

This study included four children with a familial form of the disease. Of these, two had exon 17 (D⁸¹⁶V) mutations without any history of KIT-related tumors (other than mastocytosis). The other two lacked c-KIT mutations. In contrast, Longley *et al.* (1996) did not find exon 17 mutations in three cases of familial childhood mastocytosis, and, similarly, Rosbotham *et al.* (1999) did not find exon 17 mutations in three siblings with familial urticaria pigmentosa. Furthermore, the four patients in this study with familial mastocytosis lacked the A⁵³³D germline mutation that was previously reported in a kindred with childhood-onset familial mastocytosis (Tang *et al.*, 2004), as well as the Δ^{419} and K⁵⁰⁹I mutations, which were originally identified in kindreds with a combination of familial GISTs and mastocytosis (Hartmann *et al.*, 2005) and with familial mastocytosis (Zhang *et al.*, 2006), respectively. These four patients also lacked mutations in exons 8, 9, and 11, although the number of patients was too low to reliably assess whether there is any meaningful correlation. In general, these results confirm that familial childhood-onset mastocytosis can occur both in the presence and in the absence of c-KIT mutations.

In the 13 patients from whom we could collect blood samples, we were able to examine genomic DNA for the presence of c-KIT mutations. Mutations were not found in any of these cases, suggesting that the mutations are somatic rather than in the germline. This included one of the patients with a familial form of mastocytosis, suggesting that it can arise from causes other than germline mutations in c-KIT. Interestingly, this was true for several different mutations,

including in the phosphotransferase and regulatory domains. This finding supports the idea that, in most cases, childhood mastocytosis is a clonal disease. Moreover, overall, the mutations did not seem to cause any changes in mRNA splicing, as indicated by the S/L ratio, although there was a less than twofold difference in one case.

We were unable to detect mutations in only 14% (7/50) of the children in this study. This may be attributable to a lack of sensitivity of our direct sequencing technique, but previous studies suggest that it is a result of the absence of genetic alterations within *c-KIT* in some mastocytosis patients (Longley et al., 1999; Valent et al., 2003a). This implies that these patients have alterations in proteins other than KIT that regulate mast cell proliferation and function.

Collectively, the results reveal that, like adult-onset mastocytosis, most cases of childhood-onset mastocytosis are clonal in nature and are associated with activating mutations in *c-KIT*. How the pediatric form can spontaneously resolve if it is a clonal disease is not clear and is a major question that remains to be resolved. The understanding of this process may open new avenues in the treatment of adult mastocytosis and may apply in other cancers as well. In addition, long-term follow-up is needed to determine whether spontaneous resolution is associated with particular *c-KIT* mutations. We propose that *c-KIT* mutation analysis should be performed only in clinical trials and in the few severe cases in which a treatment must be chosen and targeted therapy could be interesting. Our findings suggest that, as in adult mastocytosis, KIT could be a good target in the treatment of pediatric mastocytosis.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We assessed patients with childhood-onset cutaneous mastocytosis in a multicenter clinical study. Mastocytosis was suspected by the presence of a positive Darier's sign and was confirmed by histological analyses. A specific clinical records form was specially designed for this multicenter study to record the type of mastocytosis, familial history, and results of a complete clinical examination. For all patients with mastocytosis, the type of skin lesion was classified as mastocytoma (one to three lesions presenting as red-brown elevated plaques or nodules), urticaria pigmentosa (red-brown macules, papules, or nodules with a random distribution), or diffuse cutaneous mastocytosis (diffuse skin infiltration by mast cells and increased erythema, with frequent vesicles) (Tharp, 1985; Longley et al., 1995). When there was evidence of cutaneous and extracutaneous infiltration by mast cells, patients were diagnosed with systemic mastocytosis; however, as stipulated by our ethics committee, extracutaneous biopsies and blood samples could not be collected unless necessary for treating the patient. Therefore, we cannot rule out that some cases might have been classified as systemic if biopsies had been performed. Death was censored. Parents of the patients in all centers signed the informed-consent and authorization forms for the study protocol, including genetic analysis, and 2-mm biopsy samples were collected from a cutaneous lesion after informed consent had been obtained. This study was approved by the ethics committee of Hôpital Necker and was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki Principles protocol.

Mutation screening

Total RNA was extracted from cutaneous biopsy samples using an RNeasy Mini Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). RNA was reverse transcribed into cDNA using a StrataScript first-strand synthesis system (Stratagene, Massy, France) and random hexamer primers in a total volume of 25 μ l, according to the manufacturer's instructions. Next, the *c-KIT* coding sequence was amplified from 2.5 μ l of cDNA by PCR, using HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen S.A.) and the primers listed in Supplementary Table 1 for 40 cycles at 94 °C for 30 seconds, 57 °C for 30 seconds, and 72 °C for 45 seconds. For the specific detection of mutations at codon 816, primers U2 and L1 were used. The PCR products were purified using a GeneClean III KIT (Qbiogene, Illkirch-Graffenstaden, France), and the entire *c-KIT* coding region was directly sequenced using a BigDye terminator v1.1 kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), the sequencing primers listed in Supplementary Table 1, and an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems). Because mast cells are the main source of *c-KIT* mRNA in mastocytosis lesions, the presence of both mutant and wild-type sequences indicates either heterozygosity or a nonclonal mast cell population in biopsies. The D^{816V} mutation was also confirmed by PCR amplification of the *c-KIT* coding sequence using the fluorescent primers U2F and L1F (see Supplementary Table 1), followed by restriction digestion using *BsmA1* and *PleI*, which detect the wild-type and mutant forms of *c-KIT*, respectively. The restriction fragments were separated on an ABI Prism 3100 16-capillary sequencer, and the size of the restriction fragments was determined by comparison with the sizes of Genescan ROX 500 markers (Applied Biosystems) using GeneMapper software (Applied Biosystems).

Determination of the GNNK/GNNK+ isoform (S/L) ratio

Wild-type and mutant isoforms of *c-KIT* were simultaneously detected using the LAPP method (Theou et al., 2004) using fluorescent primers with the following sequences: forward, 5'-CCTAGTGTCCTCAATTCTGACG-3' (corresponding to nucleotides 1176–1195); reverse, 5'-CGATTACGAAACCAATCAGCA-3' (corresponding to nucleotides 1594–1574). Fluorescent amplicons were separated by capillary electrophoresis and identified according to their size, which was determined by comparison with ILS-600 size markers (Promega, Madison, WI). The short isoform (GNNK) produced a 404-bp fragment, and the long isoform (GNNK+) produced a 416-bp fragment. The length of the PCR fragment obtained from the mutated alleles was calculated by adding or subtracting the number of base pairs inserted or deleted, respectively. The area under the curve for each peak of fluorescence was determined using GeneMapper software (Applied Biosystems). The ratio of short to long isoforms (S/L) was calculated for each patient sample for both wild-type and mutated alleles.

Analysis of genomic DNA

Genomic DNA was purified from blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), amplified with intronic primers (see Supplementary Table 1), and sequenced as described above (see "Mutation screening").

Immunoprecipitation and western blotting

Cos cells were transiently transfected with pcDNA3 plasmids for expressing human wild-type or mutant *c-KIT* and treated with or without 250 ng ml⁻¹ SCF (Amgen, Thousand Oaks, CA). Cell lysates

were prepared as previously described (Ma *et al.*, 1999b). Western blotting for KIT tyrosine phosphorylation and KIT protein was performed using an anti-phospho-c-KIT (Tyr⁷¹⁹) antibody and a rabbit anti-human KIT polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), respectively.

Statistical analysis

All criteria were analyzed using descriptive statistics, numbers, and rates for categorical and discontinuous variables, and parametric and nonparametric distribution elements for continuous variables. The correlation between phenotypes and genotypes was examined by comparison of the frequencies using χ^2 -test or Fisher's exact test and by comparison of the means using Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U*-test.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no competing interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tetsuro Noguchi, Sébastien Letard, Katia Hanssens, and Stéphanie Guéry for their excellent technical assistance. This work was supported in part by funds from the following: INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale); la Ligue Nationale Contre le Cancer "équipe labellisée"; the Ministry of Research, GIS-Institut des Maladies Rares, France; Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares de France; and AFIRMM (Association Française pour les Initiatives de Recherche sur le Mastocyte et les Mastocytoses).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD (2004) A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 103:3222-5
- Akin C, Metcalfe DD (2004) Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med* 55:419-32
- Bayle J, Letard S, Frank R, Dubreuil P, De Sepulveda P (2004) Suppressor of cytokine signaling 6 associates with KIT and regulates KIT receptor signaling. *J Biol Chem* 279:12249-59
- Ben-Amitai D, Metzker A, Cohen HA (2005) Pediatric cutaneous mastocytosis: a review of 180 patients. *Isr Med Assoc J* 7:320-2
- Broudy VC (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90:1345-64
- Broudy VC, Lin NL, Sabath DF (2001) The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine* 15:188-95
- Buttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J (1998) Identification of activating c-kit mutations in adult, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol* 111:1227-31
- Caruana G, Cambareri AC, Ashman LK (1999) Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 18:5573-81
- Foster R, Byrnes E, Meldrum C, Griffith R, Ross G, Upjohn E *et al.* (2008) Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol* 159:1160-9
- Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D *et al.* (1999) c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 105:894-900
- Gilliland DG, Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532-42
- Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S *et al.* (2005) Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19:1536-42
- Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C *et al.* (2005) Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 129:1042-6
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H *et al.* (2003a) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 21:4342-9
- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N *et al.* (2003b) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299:708-10
- Inokuchi K, Yamaguchi H, Tarusawa M, Futaki M, Hanawa H, Tanosaki S *et al.* (2002) Abnormality of c-kit oncoprotein in certain patients with chronic myelogenous leukemia—potential clinical significance. *Leukemia* 16:170-7
- Kisilewicz AE, Duran-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutierrez-Castrellon P, Ruiz-Maldonado R (2004) Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 18:285-90
- Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovich KA (1998) SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol* 18:2089-99
- Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Ponten E, Carlberg M, Ronnstrand L (1999) Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* 18:5546-53
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ *et al.* (1999) Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1609-14
- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y (2001) Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 25:571-6
- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG *et al.* (1996) Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet* 12:312-4
- Longley J, Duffy TP, Kohn S (1995) The mast cell and mast cell disease. *J Am Acad Dermatol* 32:545-61; quiz 562-4
- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G *et al.* (2000) KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 156:791-5
- Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ (1999a) Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 274:13399-402
- Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH (1999b) Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 112:165-70
- Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN *et al.* (2004) Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-KIT tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279:31655-63
- Nagata H, Worobec AS, Metcalfe DD (1996) Identification of a polymorphism in the transmembrane domain of the protooncogene c-kit in healthy subjects. *Exp Clin Immunogenet* 13:210-4
- O'Brien S, Tefferi A, Valent P (2004) Chronic myelogenous leukemia and myeloproliferative disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 146-62
- Qiu FH, Ray P, Brown K, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P (1988) Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family—oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 7:1003-11

- Rosbotham JL, Malik NM, Syrris P, Jeffery S, Bedlow A, Gharraie S *et al.* (1999) Lack of c-kit mutation in familial urticaria pigmentosa. *Br J Dermatol* 140:849–52
- Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD (2004) A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet* 41:e88
- Tharp MD (1985) The spectrum of mastocytosis. *Am J Med Sci* 289:119–32
- Theou N, Tabone S, Saffroy R, Le Cesne A, Julie C, Cortez A *et al.* (2004) High expression of both mutant and wild-type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochim Biophys Acta* 1688:250–6
- Valent P, Akin C, Sperr WR, Escribano L, Arock M, Horny HP *et al.* (2003a) Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res* 27:635–41
- Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Arock M, Lechner K *et al.* (2003b) Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol* 122:695–717
- Verzijl A, Heide R, Oranje AP, van Schaik RH (2007) C-kit Asp-816-Val mutation analysis in patients with mastocytosis. *Dermatology* 214:15–20
- Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F (2005) c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn* 7:252–7
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ *et al.* (1987) Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6:3341–51
- Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J (2007) Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130:323–34
- Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV *et al.* (2006) A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis: *in vitro* and *in vivo* responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 30:373–8

Blood CD34⁻c-Kit⁺ cells rate correlates with aggressive forms of systemic mastocytosis and behave like a mast cell precursor.

Georgin-Lavialle Sophie*, Baude Cédric*, Barete Stéphane, Lhermitte Ludovic, Jean-Marie Launay, Marie-Olivia Chandesris, Katia Hanssens, Catherine Grandpeix-Guyodo, De Gennes Christian, Damaj Gandhi, Fanny Lanternier, Lortholary Olivier, Dubreuil Patrice, Feger Frédéric, Hermine Olivier, Lepelletier Yves.

*: copremiers auteurs

Accepté avec révisions à Blood (brief report).

Introduction : Les mastocytes sont issus de progéniteurs médullaires qui passent dans le sang sous forme de précurseurs puis se différencient en mastocytes sous l'influence du Stem Cell Factor (SCF). Les mastocytes tumoraux rencontrés au cours de la mastocytose systémique sont porteurs d'une mutation de c-Kit. Si la mutation apparaît dans le précurseur, on doit trouver des cellules circulantes CD34⁻Ckit⁺ dans le sang des patients atteints de mastocytose. L'objectif était de rechercher un excès de cellules Ckit⁺ dans le sang de patients ayant une mastocytose systémique.

Méthodologie : Des patients atteints de mastocytose (n=50) ont été inclus en prospectif et comparés à des contrôles sains (n=15). Un phénotypage sanguin a été réalisé et corrélé aux données cliniques et génétiques. Chez 3 sujets ayant une forme agressive, un phénotype a été réalisé au cours du temps puis corrélé à l'évolution clinique et aux traitements.

Résultats : Il existe un excès de la population CD34⁻Ckit⁺ dans le sang des patients atteints de mastocytose. Le taux sérique de cette population est corrélé à l'activité de la maladie : il est plus élevé dans les formes agressives que dans les formes indolentes de mastocytose. Le suivi chez 3 patients au cours du temps de cette population montre qu'il est corrélé à l'efficacité des traitements et aux rechutes de la maladie. Nous avons isolé les cellules CD34⁻Ckit⁺ dans le sang de contrôles sains et de patients (ayant la mutation D816V de *c-Kit*) et montré qu'après 4 semaines de culture +/- SCF, il donne naissance à un mastocyte mature.

Conclusion/perspectives : Nos résultats sur une grande cohorte de patients atteints de mastocytose montrent que phénotypage du sang périphérique pourrait être utile, en plus de l'aspiration de la moelle osseuse, pour étudier phénotype des mastocytes. Il pourrait représenter une alternative au myélogramme afin de suivre l'activité de la maladie ou de surveiller l'efficacité du traitement, car le résultat cette technique est rapide, reproductible et plus sensible que la mesure de la tryptase sérique. Nos conclusions éclairent la physiopathologie de la mastocytose et l'ontogenèse de la lignée mastocytaire normale en fournissant des preuves solides que l'accumulation tissulaire par les mastocytes provient de l'amplification d'un précurseur circulant capable de se différencier et survivre indépendamment du SCF. Ces données pourraient ouvrir de nouvelles avenues dans le domaine de la recherche sur les précurseurs des mastocytes.

Title

Blood CD34⁺c-Kit⁺ cells rate correlates with aggressive forms of systemic mastocytosis and behave like a mast cell precursor.

Authors:

Georgin-Lavialle Sophie^{1,2*}, Baude Cédric^{3*}, Barete Stéphane^{2,4}, Lhermitte Ludovic⁵, Jean-Marie Launay⁶, Marie-Olivia Chandesris¹, Katia Hanssens⁷, Catherine Grandpeix-Guyodo¹, De Gennes Christian⁸, Damaj Gandhi⁹, Fanny Lanternier¹⁰, Lortholary Olivier¹⁰, Dubreuil Patrice⁷, Feger Frédéric², Hermine Olivier^{1,2**}, Lepelletier Yves^{2**}.

Affiliations:

¹ Service d'Hématologie Adultes et centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Necker-Enfants malades ; Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

²CNRS UMR 8147, Hôpital Necker-Enfants malades ; Université Paris Descartes, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

³AFIRMM (Association Française pour les Initiatives de Recherche sur le Mastocyte et les Mastocytoses), 3 Avenue George V, 75008 Paris, France.

⁴Département de Dermatologie-Allergologie, et centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Tenon, Université Paris VI, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

⁵Laboratoire de cyto-hématologie, Hôpital Necker; Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 161 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

⁶ Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, INSERM U942, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

⁷ INSERM UMR 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Laboratoire d'Hématopoïèse Moléculaire et Fonctionnelle, Marseille, France.

⁸Service de médecine interne 2, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 Bd de l'hôpital 75013 Paris, France.

⁹ Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens, France

¹⁰ Service des Maladies infectieuses et tropicales, et centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Necker-Enfants malades, Université Paris V.

* Both authors contributed equally to this work

** Both authors codirected this work.

Corresponding author: Pr. Olivier Hermine

Service d'Hématologie Adultes, CNRS UMR 8147 et centre de référence sur les mastocytoses,

Hôpital Necker-Enfants malades

Université Paris Descartes

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

149 Rue des Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

E-mail: ohermine@gmail.com

Word counts: abstract: 149; text: 1059

Category: MYELOID NEOPLASIA (Brief report)

Abstract

Mastocytosis is a heterogeneous disease characterized by mast cells accumulation in one or more organs. Our objective was to identify a peripheral mast cell precursor and assess its variation rate within different clinical mastocytosis features. A peripheral blood phenotype was performed among 50 patients with mastocytosis, enrolled in a prospective multicentric french study and compared to healthy donors. Three patients with aggressive mastocytosis were followed at each hospitalization time. The rate of peripheral blood CD34⁺C-KIT⁺ cells correlated to the severity of mastocytosis. This cellular population was isolated from healthy donors as well as patients with systemic mastocytosis and, after 30 days of culture, gave birth to mature mast cells, thus indicating that this population constitute a mast cell circulating precursor. Monitoring peripheral CD34⁺C-KIT⁺ cells by flow cytometry could be a useful and non invasive tool to screen the severity of the disease, the relapses and to assess treatment efficiency.

Key words:

MASTOCYTOSIS, MAST CELL, KIT, PROGNOSIS, TREATMENT.

Introduction

Mastocytosis is a rare heterogeneous disease characterized by mast cells (MC) accumulation in one or several organs ¹⁻⁶. A WHO classification described several disease subcategories, broadly divided into localized versus systemic disease. Systemic mastocytosis (SM) is subsequently divided into indolent and aggressive disease based on organ injuries ⁶⁻⁸. The c-Kit tyrosine kinase receptor is expressed on MC. Adults with SM usually present *c-Kit* mutations, most frequently D816V, allowing MC survival and proliferation. Recently, flow cytometric studies showed that pathologic MCs from patients with mastocytosis, in addition to c-Kit expression, display unique aberrant immunophenotypic characteristics, as compared with normal MCs ⁹⁻¹⁴. Normal mast cells derivate from CD34⁺c-Kit⁺ blood precursors, which terminally differentiate in peripheral tissues upon SCF stimulation ¹⁵.

Our study aimed to detect CD34⁺c-Kit⁺ cells in peripheral blood (PB) of patients with mastocytosis and investigate whether or not these CD34⁺c-Kit⁺ cells could give birth to mature MC in the presence or absence of SCF and to investigate its relevance for positive diagnosis, classification and follow-up.

Patients and methods

Patients and data collection:

Fifty consecutive patients (26 men/24 women) with mastocytosis diagnosis as defined by the WHO criteria ⁶ and 15 healthy donors were enrolled in a prospective national multicentric study between 1999/2008. Mastocytosis subcategories comprised cutaneous (n=4), indolent SM (n=25), aggressive SM (n=16) and SM with associated haematological non-MC-lineage disease, namely SM-AHNMD (n=5). Median age on phenotype was 52 years [7-75]. Three patients (patient 32, 38 and 42) were followed at each hospitalization. A PB phenotype was performed (see below) and results were correlated to clinical manifestations and treatment responses. All patients were included in “mastocytosis pathophysiological study”, which started in 2003 and is sponsored by AFIRMM promoter. The study was approved by Necker hospital ethical committee, and carried out according to the Helsinki convention. Each patient provided informed consent. The results of *c-Kit* gene sequencing looking for D816V mutation in skin, blood and/or bone marrow was available. The D816V mutation of *c-Kit* was detected among 35 patients, including patients 32, 38, 42. Thirteen were *c-Kit* WT (Table).

PBMC isolation, Flow cytometry analysis and cell culture

Blood was collected on heparinized tubes and PBMC were isolated by Ficoll-IPaque gradient (Amersham Life Science, U.K). PBMCs were stained using: CD34 conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) and CD117/c-Kit to phycoerythrin (PE); Control isotype-matched antibodies were used at appropriate concentration (Beckman Coulter®). After washing, 2×10^4 events were analysed by FACS-Calibur (Becton Dickinson®). c-Kit⁺ cells were sorted after c-Kit-APC staining associated to APC-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec®). c-Kit⁺ sorted cells were stained with CD34-FITC, c-Kit-APC and CD45-PerCP (Beckton Dickinson). c-Kit⁺CD34⁻CD45^{low} cells were sorted on a BD Aria 1[®] FACS sorter and cultured on 96 well plates in 200 µL of IMDM medium supplemented ¹⁶ for 30 days with or without Stem cell factor (SCF) adjunction (50 µg/mL). Medium was renewed twice a week. For each cyospin, 100 µL of PBS 2% FBS containing 10,000 sorted cells were used and stained with May Grünwald Giemsa at culture day 0 and 30. Histamine was measured in the supernatant as previously described ¹⁷.

D816V c-Kit mutation detection and serum tryptase measurement

D816V c-Kit mutation was determined as previously described ^{18,19}. Total serum tryptase (protryptase + β-tryptase) was measured using fluorescent enzyme-linked immunoassay (Unicap; Pharmacia) ²⁰. The detection limit of this assay is 1 ng/mL, and in healthy controls, serum tryptase levels range between <1 and 15 ng/mL, with a median of ~ 5 ng/mL ²¹.

Statistical analysis:

Statistical comparisons between characteristics of healthy donors and patients (CM, ISM, ASM, SM-AHNMD) were based on unpaired t test. All reported p values were two tailed with confidence intervals of 95% and p value <0.05 was considered significant. Data were analyzed using GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results and discussion

The rate of the circulating CD34⁺c-Kit⁺ cell population was significantly increased among SM subcategories patients (all $p < 0.005$) compared to healthy donors and CM patients (Fig. 1A, 1B). This rate was more elevated among ASM and SM-AHNMD patients than indolent forms. Serum tryptase rate analysis revealed that tryptase was significantly increased in all mastocytosis subcategories (CM $p = 0.0385$; ISM $p = 0.0242$, ASM $p = 0.0005$ and SM-AHNMD $p = 0.0012$). The number of CD34⁺c-Kit⁺ was assessed during disease evolution and under different treatments from three ASM patients (Fig. 1C, 1D, 1E). These results showed that CD34⁺c-Kit⁺ cell percentage decreased 24 to 48 hours after each efficient treatment and increased after each relapse, preceding serum tryptase levels modification. Taken together, these results showed that a circulating CD34⁺c-Kit⁺ cell population existed among patients with mastocytosis and the population rate correlated with mast cell burden, being more elevated among SM subcategories compared to CM subcategories and to healthy donors ($p = 0.0146$ versus 0.178). This CD34⁺c-Kit⁺ cell population was especially increased in the most aggressive subcategories of systemic mastocytosis, ASM and SM-AHNMD, which are associated with poor prognosis and shortened life expectancy^{22,23}. The CD34⁺c-Kit⁺ cell population number correlated to cytoreductive treatment efficiency and could predict clinical disease relapses (Fig. 1C-E).

CD34⁺c-Kit⁺ cells were isolated, from healthy donors ($n = 3$) and patients ($n = 3$), and cultured in a medium supplemented or not with SCF. In these three patients, we detected the D816V *c-Kit* mutation by PCR analysis in the PBMC's. After 30 days of culture in the presence of SCF, mature MC were identified by morphology and histamine secretion (Fig. 1F). In absence of SCF, only MC derived from patients bearing *c-Kit* D816V mutation were able to differentiate into mature MC, in contrast to healthy donors. This result suggested that the auto-activating D816V *c-Kit* positive MC precursor could mature, independently from SCF.

Previous series reporting MC immunophenotype on large patient cohorts were usually performed on bone marrow (BM) MCs, as recommended^{10,12,14}. Our results on a large patient cohort show that PB-phenotype could be useful, in addition to BM aspiration, to study MCs phenotype among patients with mastocytosis; and could represent an alternative from BM aspiration to follow disease activity or to monitor treatment efficiency, because the result of PB-phenotype is fast, reproducible, and more sensitive than serum tryptase measurement.

In addition, our findings brings light to the pathophysiology of mastocytosis and normal MC lineage development by providing strong evidence that tissue MC accumulation originate from the amplification of blood circulating precursors that are able to differentiate and survive independently from SCF. These data might open new avenues in the field of research on MC precursors.

References

1. Horny HP, Parwaresch MR, Lennert K. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol.* 1985;16:808-814.
2. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology.* 1979;3:349-365.
3. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol.* 1991;96:2S-4S.
4. Valent P. Biology, classification and treatment of human mastocytosis. *Wien Klin Wochenschr.* 1996;108:385-397.
5. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res.* 2001;25:603-625.
6. Valent P HH-P, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB et al. ed Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of tumours. In: Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW, editors ed. Vol. 1. Lyon, france: IARC Press; 2001.
7. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Mast cell proliferative disorders: current view on variants recognized by the World Health Organization. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003;17:1227-1241.
8. Valent P, Scherthaner GH, Sperr WR, et al. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev.* 2001;179:74-81.
9. Escribano L, Diaz-Agustin B, Bellas C, et al. Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leuk Res.* 2001;25:563-570.
10. Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;58:1-8.
11. Escribano L, Diaz-Agustin B, Nunez R, Prados A, Rodriguez R, Orfao A. Abnormal expression of CD antigens in mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127:127-132.
12. Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood.* 1998;91:2731-2736.
13. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, et al. Sequential immunophenotypic analysis of mast cells in a case of systemic mast cell disease evolving to a mast cell leukemia. *Cytometry.* 1997;30:98-102.

14. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*;125:719-726, 726 e711-726 e714.
15. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*. 1999;94:2333-2342.
16. Arock M, Le Nours A, Malbec O, Daeron M. Ex vivo and in vitro primary mast cells. *Methods Mol Biol*. 2008;415:241-254.
17. Lebel B. A high-sampling-rate automated continuous-flow fluorometric technique for the analysis of nanogram levels of histamine in biological samples. *Anal Biochem*. 1983;133:16-29.
18. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*;130:804-815.
19. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med*. 2008;22:1301-1309.
20. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, et al. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol*. 1994;14:190-204.
21. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98:2200-2209.
22. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113:5727-5736.
23. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009.

Acknowledgments

The authors wish to thank the following physicians for collecting patient data: Drs. M. Blanc (Chambéry), D. Bordessoule (Limoges), O. Fain (Bondy), C. Hoarau (Tours), H. Coignard (Paris), F. Suarez (Paris) and C. Roux-Serratrice (Marseille). We are also grateful to François Machavoine, Fabienne Palmérini, Elke Schneider and Françoise Valensi for technical assistance and helpful discussions.

Fundings

S. G-L is a recipient from a grant from the Fondation pour la Recherche médicale (FRM). This work was partially financed by INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée PD) and ANR-MRAR (Agence Nationale pour la Recherche, grant Maladies Rares – PD and OH) and Inca (Institut National du Cancer, grant translationnel PD and OH).

Author contributions

Contributions:

S. G-L wrote the manuscript, carried out experiments, collected data, analyzed and interpreted data.

Y.L designed the study, carried out experiments, collected, analyzed, interpreted data, and assisted in writing the manuscript.

O.H assisted in writing the manuscript.

P.D, F.F, S.B carried out experiments, collected data, analyzed, interpreted data and assisted in writing the manuscript.

C.B, K.H, L.L, carried out experiments, collected and analyzed data.

C. G-G, M-O. C, J-M. L, C de G, G.D, F.L, O.L, helped design the study, edited the manuscript and recruited patients.

Competing interests

The authors declare no competing interest

Abbreviations

ASM: Aggressive systemic mastocytosis

CM: Cutaneous mastocytosis

FBS: foetal bovine serum

ISM: Indolent Systemic mastocytosis

MC: Mast cell

MCL: Mast cell leukaemia

MCS: Mast cell sarcoma

PB: Peripheral blood

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PBS: phosphate-buffered saline

SCF: Stem cell factor

SM: Systemic mastocytosis

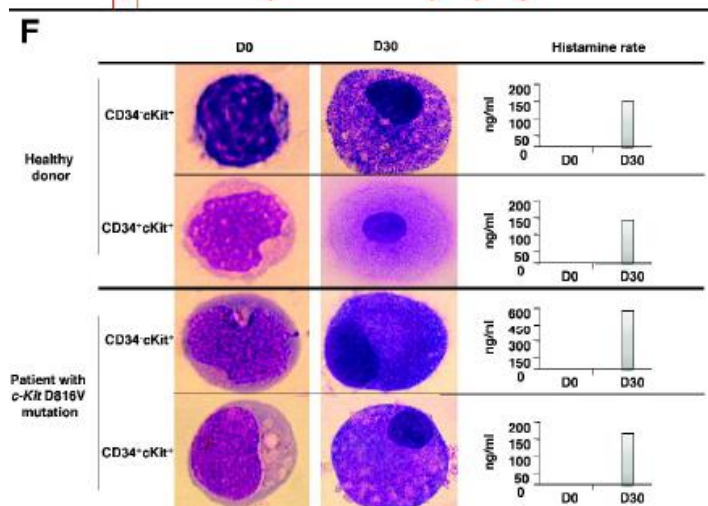
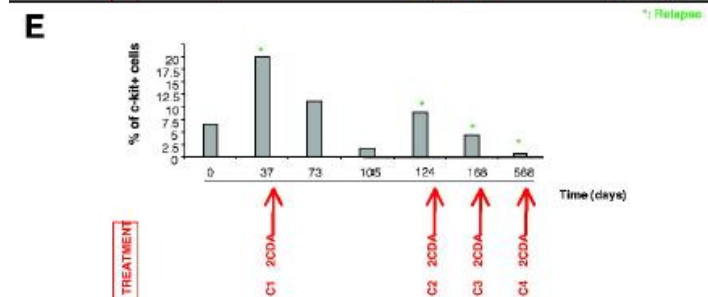
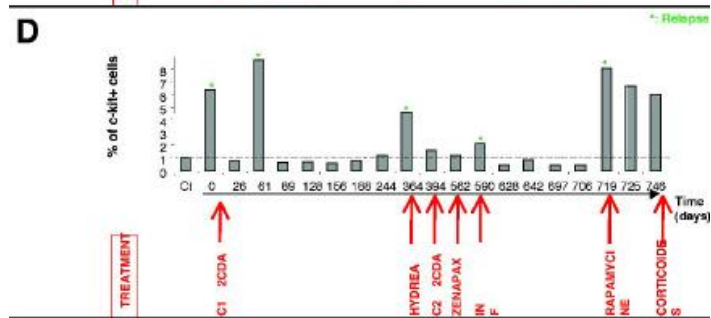
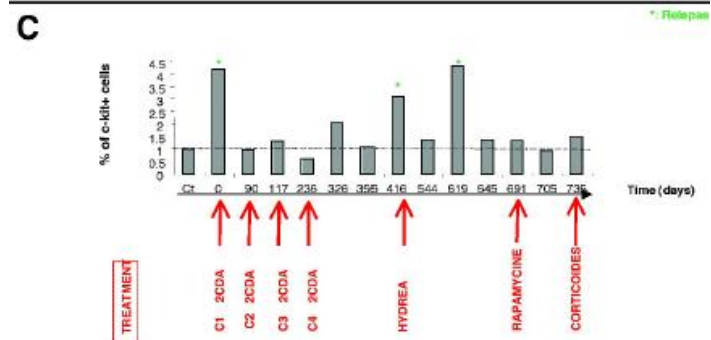
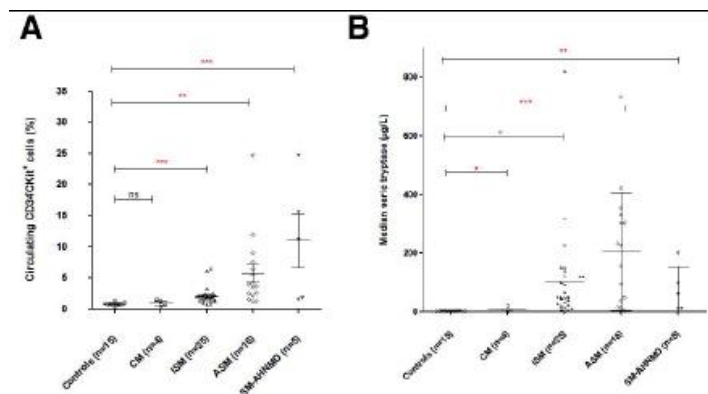
SM-AHNMD: SM with an associated clonal haematological non-MC-lineage disease

Figure legends :

Figure 1: (A, B) Correlation of Valent's stage disease and the rate of circulating CD34⁺c-Kit⁺ population and the rate of serum tryptase. (A) The rate of the circulating CD34⁺c-Kit⁺ is shown for each patient with their disease stage, indicating the aggressivity of their disease, and compared to healthy controls. Patients with systemic forms versus cutaneous forms have a significantly more elevated rate of CD34⁺c-Kit⁺ cells. This association is not found for cutaneous forms which are comparable to healthy controls. **(B)** The serum rate of tryptase is always elevated among patients with mastocytosis, independently from the stage of the disease: cutaneous as well as systemic forms have an elevated serum tryptase. (CM: cutaneous mastocytosis, SM: systemic mastocytosis, ISM: Indolent SM, ASM: aggressive SM, SM-AHNDM: SM associated to hematological non mast cell disease). **(C, D, E). Clinical and biological follow-up of three patients with aggressive systemic mastocytosis until their death.** On each panel (C) Patient 42; (D) Patient 32; (E) Patient 38, the clinical evolution and the treatment is mentioned as well as the rate of the circulating CD34⁺c-Kit⁺ population. It shows that when patients present aggressive disease with massive mast cell infiltration, the rate of the circulating CD34⁺c-Kit⁺ population is a good tool to follow fastly (within 24-48 hours) the clinical evolution of the disease and efficiency of treatments. (CT: healthy control, 2CDA: Leustatine, Zenapax: Daclizumab; C1 to C4: cure number). **(F) Aspects and histamine production of isolated CD34⁺c-Kit⁺ cells of one healthy control and one patient with *c-Kit* D816 mutation.** Isolation of c-Kit⁺CD34⁺ cells from healthy donor (upper panel) and patient bearing *c-Kit* D816V mutation (lower panel). Microscopic aspect analysis after a may-grünwald-giemsa coloration on the first day and after 30 days of culture. Clearly, the CD34⁺c-Kit⁺ cells are able to differentiate into mature mast cells as well as CD34⁺c-Kit⁺ cells which belong to hematopoietic classical progenitors, known to be able to give rise to mast cells. The CD34⁺c-Kit⁺ population may contain a circulating mast cell precursor. On the left: measurement of histamine rate¹⁷ in culture. This rate is elevated in all cases. For all patients, the same results were obtained independently of the presence or not of SCF rate in culture. This indicates that the *c-Kit* D816V mutation must be carried by these circulating precursor cells.

Table: Main features of the study population (nd = not done)

Patient's number	Age at phenotype	Tryptase (µg/L)	Valent stage	<i>c-Kit</i> Mutation
1	44	20	CM	D-816-V
2	39	5	CM	WT
3	49	1	CM	WT
4	12	5	CM	WT
5	57	45	ISM	D-816-V
6	63	50	ISM	D-816-V
7	67	9	ISM	D-816-V
8	26	22	ISM	D-816-V
9	75	124	ISM	D-816-V
10	40	153	ISM	WT
11	52	93	ISM	D-816-V
12	51	21	ISM	WT
13	65	318	ISM	D-816-V
14	49	40	ISM	D-816-V
15	43	16	ISM	D-816-V
16	60	140	ISM	D-816-V
17	75	2	ISM	D-816-V
18	57	48	ISM	WT
19	37	11	ISM	D-816-V
20	37	50	ISM	D-816-V
21	30	49	ISM	WT
22	55	229	ISM	WT
23	23	100	ISM	D-816-V
24	39	6	ISM	D-816-V
25	72	822	ISM	D-816-V
26	18	28	ISM	D-816-V
27	62	33	ISM	D-816-V
28	30	68	ISM	D-816-V
29	26	152	ISM	D-816-V
30	45	17	ASM	D-816-V
31	38	233	ASM	WT
32	70	421	ASM	D-816-V
33	72	304	ASM	D-816-V
34	25	228	ASM	D-816-V
35	36	49	ASM	D-816-V
36	7	734	ASM	D-816-V
37	42	15	ASM	D-816-V
38	68	304	ASM	D-816-V
39	70	330	ASM	WT
40	43	3	ASM	WT
41	74	156	ASM	D-816-V
42	49	39	ASM	D-816-V
43	55	95	ASM	WT
44	64	5	ASM	nd
45	32	356	ASM	D-816-V
46	72	200	SM-AHNMD	D-816-V
47	52	62	SM-AHNMD	D-816-V
48	54	12	SM-AHNMD	WT
49	40	10	SM-AHNMD	D-816-V
50	73	98	SM-AHNMD	D-816-V



Mast cell leukemia: identification of a new *c-Kit* mutation, dup(501-502), and response to masitinib.

Georgin-Lavialle S, Suarez F, Lepelletier Y, Yang Y, Letard S, Hanssens K, Feger F, Renand A, Lhermitte L, Brouze C, Grandpeix-Guyodo C, Canioni D, Asnafi V, Gineste P, Macintyre E, Mansfield C, Moussy A, Dubreuil P and Hermine O.

Soumis à European Journal of Haematology (article original).

Introduction : La leucémie à mastocytes est une forme extrêmement rare de mastocytose définie par l'infiltration massive de la moelle osseuse par des mastocytes tumoraux atypiques. Son pronostic est très réservé et il n'existe pas de traitement curatif. Nous rapportons le cas d'un patient ayant une leucémie à mastocytes associée à une nouvelle mutation de *c-Kit* qui a répondu de façon spectaculaire à un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase.

Cas clinique : Une femme de 66 ans présentait depuis quatre ans des malaises, des flush sans sueurs, une diarrhée profuse et des éruptions cutanées érythémateuses. Son examen clinique était sans particularités. Le frottis sanguin montrait sept pourcent de mastocytes anormaux. Le phénotypage sanguin retrouvait 42% de cellules CD34⁻cKit⁺. Les taux sériques d'histamine et de tryptase étaient très élevés. A la biopsie ostéomédullaire, on notait une infiltration massive par des mastocytes anormaux, exprimant le c-Kit. Le séquençage total du gène *c-Kit* retrouvait une délétion deux acides aminés (del 501,502). L'ensemble de ces résultats étant compatibles avec une leucémie à mastocytes. Un traitement par un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase, l'AB1010, était instauré (200 mg x2 / jour).

Résultats : L'AB1010 a été bien toléré. Après trois mois de traitement, la réponse était spectaculaire : le frottis sanguin ne retrouvait plus de mastocytes anormaux circulants et sur le phénotypage sanguin, la population CD34⁻cKit⁺ était passée de 42 à 2%. Les taux sériques d'histamine et tryptase étaient quasi normalisés. La biopsie médullaire montrait une diminution de 90 à 48% de l'infiltration par les mastocytes tumoraux.

Discussion et Perspectives : Ce cas clinique permet d'illustrer une entité rare : la leucémie à mastocytes et de souligner l'importance de penser à la mastocytose devant des malaises avec flushs sans sueurs perdurant depuis plusieurs années. Nous rapportons l'efficacité d'un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase dans cette forme rare et grave de mastocytose. Ce cas souligne l'intérêt du phénotypage sanguin à la recherche des cellules CD34⁻cKit⁺ pour le diagnostic positif de la mastocytose agressive et celui des rémissions et/ ou rechutes.

Enfin, ce cas expose une nouvelle mutation de *c-Kit* codant pour la partie extracellulaire du récepteur, responsable de son autoactivation, alors que ce sont habituellement les mutations des formes pédiatriques qui sont situées dans ce domaine. Ceci souligne l'importance de séquencer la totalité du gène et pas uniquement l'exon 17 où se situe la mutation D816V.

Title:

Mast cell leukemia: identification of a new *c-Kit* mutation, dup(501-502), and response to masitinib, a c-Kit tyrosine kinase inhibitor.

Authors:

Sophie Georgin-Lavialle^{1,2}, Felipe Suarez², Yves Lepelletier¹, Ying Yang³, Sébastien Letard³, Katia Hanssens³, Frédéric Feger¹, Amédée Renand¹, Ludovic Lhermitte⁴, Chantal Brouze⁴, Catherine Grandpeix-Guyodo⁵, Danielle Canioni^{5,6}, Vahid Asnafi⁴, Paul Gineste⁷, Elizabeth Macintyre⁴, Colin D Mansfield⁷, Alain Moussy⁷, Patrice Dubreuil^{3°} and Olivier Hermine^{1,2,5°}.

Affiliations:

¹CNRS UMR 8147 ; Université Paris Descartes, Faculté de médecine, Paris, France.

²Service d'Hématologie Adulte, Hôpital Necker, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

³INSERM U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Laboratoire de Signalisation, Hématopoïèse et Mécanisme de l'Oncogenèse, Centre de référence des mastocytoses, Marseille, France; Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; Univ Méditerranée, Marseille, France.

⁴Laboratoire d'hématologie, Hôpital Necker, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁵Centre national de référence des mastocytoses, Université Paris Descartes, Faculté de médecine, Paris, France.

⁶Laboratoire d'anatomopathologie, Hôpital Necker, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁷AB Science, 3 avenue Georges V, Paris, France.

° Both authors co-directed this work.

Corresponding authors:

Pr. Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Université Paris Descartes, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France; Tel: +33 144 495 386; Fax: +33 144 495 280; e-mail: ohermine@gmail.com

or Patrice Dubreuil, INSERM, U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Signalisation, Hematopoiesis and Mechanisms of Oncogenesis, 27 boulevard Leirou, Marseille, F-13009, France; Phone: 33 (0) 491 758 418; Fax: 33 (0) 491 260 364; e-mail: Patrice.Dubreuil@inserm.fr

Word counts: abstract: 143; text, 1199

Abstract

Most patients with systemic mastocytosis (SM) bear mutations in the tyrosine kinase receptor gene *c-Kit*. Limited treatment options exist for mast cell leukemia (MCL), a rare form of SM that has a dire prognosis. We describe here a patient with MCL characterized by 42% of circulating mast cells associated to a previously unidentified *c-Kit* mutation: dup(501-502). This patient was treated with masitinib, a novel c-Kit tyrosine kinase inhibitor, with a dramatic response observed following 3 months of treatment, including clinical improvement, disappearance of circulating mast cells, decrease of both serum histamine and tryptase levels and no detection of constitutive c-Kit phosphorylation in MCL cells. This case highlights the importance of sequencing all *c-Kit* exons when the classical D816V *c-Kit* mutation is not found, even in adults with SM. It also indicates that masitinib may be safe and effective for the treatment of MCL.

Introduction

Mastocytosis is a rare heterogeneous disease characterized by mast cells (MC) accumulation in one or several organs¹⁻⁶. A WHO classification described several subcategories of the disease⁵⁻⁷, broadly divided into localized versus systemic disease. Systemic disease is subsequently divided into indolent and aggressive disease based on organ injuries. Mast cell leukemia (MCL) is a rare subtype of systemic mastocytosis (SM) defined by leukemic bone marrow (BM) infiltration and atypical neoplastic MCs and a severe prognosis. BM infiltration can lead to myelofibrosis with hematopoietic insufficiency, organ dysfunction, bleeding and death after a median survival time of 6-7 months⁵⁻⁷. MCL diagnosis criteria includes BM MC infiltration (> 20%) and peripheral blood circulating MC (<10%). Most patients survive less than 1 year; responding poorly to cytoreductive drugs or chemotherapy with no curative treatment available despite several trials of new molecules⁸⁻¹⁰.

The proto-oncogene *c-Kit* encodes for a transmembrane stem cell factor (SCF) receptor tyrosine kinase that is expressed on MC. Adults with SM usually present *c-Kit* tyrosine kinase domain mutations, most frequently D816V. Masitinib is a new tyrosine kinase inhibitor (TKI) with a pre-clinical profile suggesting greater affinity and selectivity *in-vitro* for the wild-type (WT) *c-Kit* and its juxtamembrane mutation than imatinib¹¹⁻¹⁴. Masitinib inhibits both human and murine wild-type KIT *in vitro*, and orally administered masitinib blocks the tumor growth of juxtamembrane-mutated KIT expressing cells in mice¹³. This molecule has also proven its efficacy in canine MC tumors¹³ and is currently under evaluation in several human clinical trials¹⁵⁻¹⁸. Considering the poor prognosis and absence of efficient MCL treatment, we evaluated *in-vivo* and *in-vitro* effects of masitinib, in a MCL patient with a newly identified ^{dup(501-502)} *c-Kit* mutation.

Methods

Patient

A 66-year-old woman presented with a history of malaise, flushes without sweating, profuse diarrhea, tingling sensations and erythematous cutaneous rashes. There were few notable physical findings:

neither splenomegaly nor rash. This study was approved by the ethical committee of Necker Hospital, was carried out in compliance with the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation, immunophenotypic and histology study

Blood and BM samples were collected at diagnosis and after 3 months of treatment. PBMCs were isolated by Ficoll-IPaque and stained using FITC, PE, PerCP or APC-coupled anti-CD34(581), CD25(M-A2S1), CD14(MSE2), CD32(3D3), CD2(S5.2), CD4(RPA-T4), CD8(RPA-T8) and CD117(YB5.B8) or with appropriate control, and analyzed by FACSCalibur (all from Becton Dickinson). Anti-CD117 from DAKO, (Carpinteria) was used for the BM immunochemistry.

Mutation screening

Total RNA was isolated from BM aspirate and cDNA was synthesized as previously described¹³.

Analysis of c-Kit tyrosine phosphorylation

Transfected-Cos cells with pcDNA3 plasmids encoding for human WT or mutant *c-Kit* were cultured with or without 1 μ M of masitinib and treated with or without 250 ng/ml SCF (Amgen). For *ex-vivo* analysis during masitinib treatment, PBMC and BM aspirates from the patient were lysed, also Cos cells, as previously described¹⁴. Immuno-blots were performed using anti-phospho-c-Kit (Tyr⁷¹⁹) (Cell Signaling Technology) with anti-Grb2 antibodies (sc255 from Santa Cruz) used as a control for protein loading.

Cells culture and assay of cell proliferation

Ba/F3 cells expressing ^{WT} *c-Kit* were cultured as previously described¹⁴. The medium was supplemented with masitinib at 0.1 or 1 μ mol/L. Cells were grown for 48h at 37°C and then incubated

with 10 µL/well of WST-1 reagent (Roche Applied Science) for 3h at 37°C. The measurements were performed as previously described¹⁴.

Results and Discussion

BM biopsy showed massive infiltration with dysmorphic spindled MCs, as highlighted by c-Kit immunohistochemical staining. These MC were characterized by clear cytoplasm, bilobated nucleus and granulous elements. Circulating MCs were identified by peripheral blood smear and blood flow cytometry immunophenotyping. BM aspirate revealed heterozygosity for a new *c-Kit* mutation: duplication (501-502) in exon 9. The absence of ^{D816V} *c-Kit* mutation was confirmed by sequencing after a RT-PCR, as previously described¹⁸, except that a more sensitive technique was used; that is, nested PCR were performed using an additional PNA-modified oligonucleotide: PNA-modified primer K816^{PNA} nucleotide position 2436 to 2461 (*c-Kit* sequence in GenBank, accession number X06182) (TCTAGCCAGAGAA^{PNA-modified}CATCAAGAATGATT). These findings were consistent with MCL.

After diagnosis confirmation, she received orally masitinib (6.5 mg/kg/d). After 3 months: symptoms of flush, eruptions, diarrhea and pollakiuria had disappeared; the percentage of peripheral blood circulating MCs markedly decreased; serum histamine and tryptase levels decreased to approximately normal values; MC infiltration on the BM biopsy also decreased. Table and Figure show relevant abnormal studies at baseline and dramatic response after 3 months of treatment. Masitinib was very well tolerated.

In our case, a new *c-Kit* mutation located in exon 9 was identified. This exon encodes for the extracellular domain of the c-Kit receptor. Usually, mutations of extracellular or juxtamembrane *c-Kit* regions are identified among children and correlate to cutaneous and non aggressive forms of mastocytosis¹⁹. Tumoral MCs were not expressing CD25, thus indicating that the cells might be very

immature; or, that MCs bearing exon 9 mutations, in contrast to *c-Kit* D816V mutation, do not express CD25.

This case represents the first reported successful treatment of MCL using a TKI. Masitinib's effectiveness was demonstrated after 3 months, as evidenced by an improvement in clinical stage, substantial decrease in BM infiltration by MCs and tryptase level, and a normalized peripheral blood phenotype. *Ex-vivo*, a western blot analysis of phospho-c-Kit on the patient's PBMC before treatment showed a phosphorylated form of c-Kit, without SCF compared to control PBMCs. This c-Kit phosphorylated form showed a gel migration comparable with a mutated form (dup⁵⁰¹⁻⁵⁰²) of the receptor transiently transfected in Cos cells. Furthermore, this ^{dup501-502} *c-Kit* showed a constitutive phosphorylation in Cos cells w SCF stimulation (Figure 1E).

In-vitro analysis of WT and dup⁵⁰¹⁻⁵⁰² KIT tyrosine phosphorylation in transfected Cos cells (Figure F and G) showed that c-Kit was not phosphorylated in untransfected cells. ^{WT} *c-Kit* in transfected Cos cells was phosphorylated only in the presence of SCF and was dephosphorylated in the presence of masitinib. In contrast, ^{dup501-502} *c-Kit* mutation in transfected Cos cells was phosphorylated independently of SCF, but masitinib remained efficient. Proliferation analysis of the patient's PBMC before treatment (Figure H; upper panel) at various concentrations of masitinib or imatinib (0.1 or 1 μmol/L), showed that both are similarly effective for inhibiting proliferation. As a control, we examined transfected Ba/F3 cell growth in the presence and absence of SCF and IL-3 (Figure H; center and lower panels). In all cases, IL-3-induced proliferation was not affected by either kinase inhibitor. Ba/F3 cells expressing ^{WT} *c-Kit* were sensitized to TKIs at 1μM in the presence of SCF. These results show that this mutation induced c-Kit autophosphorylation independently of SCF and that this effect could be inhibited by masitinib at concentrations reachable *in-vivo*¹⁷.

In summary, this is the first reported case of MCL with ^{dup(501-502)} *c-Kit* mutation in an adult patient. It highlights the importance of sequencing the entire *c-Kit* gene when searching for atypical mutations in

adults when ^{D816V} *c-Kit* is not found. This newly described mutation represents a new mechanism of c-Kit auto-activation. Masitinib, a new TKI, induced remission within 3 months and was well tolerated; therefore showing promise in the treatment of aggressive forms of SM. Indeed, due to its safety profile, selectivity¹¹ and efficiency *in-vivo*, masitinib is currently investigated in symptomatic patients with SM having less advanced disease^{12,20}.

Acknowledgements

S. G-L is a recipient from a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was partially financed by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), by AFIRMM (Association Française pour la recherche sur le mastocyte et la mastocytose), by INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée PD) and ANR-MRAR (Agence Nationale pour la Recherche, grant Maladies Rares – PD and OH), by Institut National du cancer INCa (PD) AB Science provided masitinib and sponsored this study.

Authorship contributions:

S.G-L wrote the manuscript, carried out experiments, collected data, analyzed and interpreted data.

F.S treated the patient, performed bone marrow biopsies, helped design the study, analyzed and interpreted data.

Y.L carried out experiments, collected data, analyzed, interpreted data and assisted in writing the manuscript.

Y.Y, K.H, S.L, L.L, C.B, D.C, V.A, A.R carried out experiments and collected data.

F.F and C.G-G helped design the study, analyzed and interpreted data.

O.H, A.M, C.M, E.M, P.G designed the study, interpreted data, and assisted in writing the manuscript.

P.D carried out experiments, collected data, analyzed, interpreted data and assisted in writing the manuscript.

All authors validated the final manuscript.

References

1. Horny HP, Parwaresch MR, Lennert K. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol.* 1985;16:808-814.
2. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cells and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology.* 1979;3:349-365.
3. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol.* 1991;96:2S-4S.
4. Valent P. Biology, classification and treatment of human mastocytosis. *Wien Klin Wochenschr.* 1996;108:385-397.
5. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res.* 2001;25:603-625.
6. Valent P HH-P, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB et al. ed Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of tumours. In: Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW, editors ed. Vol. 1. Lyon, france: IARC Press; 2001.
7. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res.* 2003;27:635-641.
8. Gotlib J, Berube C, Gowney JD, et al. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood.* 2005;106:2865-2870.
9. Noack F, Sotlar K, Notter M, Thiel E, Valent P, Horny HP. Aleukemic mast cell leukemia with abnormal immunophenotype and c-kit mutation D816V. *Leuk Lymphoma.* 2004;45:2295-2302.
10. Valentini CG, Rondoni M, Pogliani EM, et al. Mast cell leukemia: a report of ten cases. *Ann Hematol.* 2008;87:505-508.
11. Bellamy F, Bader T, Moussy A, Hermine O. Pharmacokinetics of masitinib in cats. *Vet Res Commun.* 2009.
12. Dubreuil P, Letard S, Ciufolini M, et al. Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One.* 2009;4:e7258.
13. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008;22:1301-1309.
14. Letard S, Yang Y, Hanssens K, et al. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1137-1145.
15. Humbert M, Casteran N, Letard S, et al. Masitinib combined with standard gemcitabine chemotherapy: in vitro and in vivo studies in human pancreatic tumour cell lines and ectopic mouse model. *PLoS One.* 2009;5:e9430.
16. Le Cesne A, Blay JY, Bui BN, et al. Phase II study of oral masitinib mesilate in imatinib-naive patients with locally advanced or metastatic gastro-intestinal stromal tumour (GIST). *Eur J Cancer.*
17. Soria JC, Massard C, Magne N, et al. Phase 1 dose-escalation study of oral tyrosine kinase inhibitor masitinib in advanced and/or metastatic solid cancers. *Eur J Cancer.* 2009;45:2333-2341.
18. Tebib J, Mariette X, Bourgeois P, et al. Masitinib in the treatment of active rheumatoid arthritis: results of a multicentre, open-label, dose-ranging, phase 2a study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R95.

19. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*;130:804-815.
20. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, et al. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS One*. 2008;3:e2266.

Table . Patient's laboratory values at baseline and after 3 months of treatment with masitinib.

	Pre treatment	Remission
Masitinib quantity per day, mg	0	400
CLINICAL FEATURES		
Weight	66	64
Flush, number per day	2	0
Pruritus	+	0
Abdominal pain	0	0
Diarrhea	0	0
Urinations	4	6
BIOLOGY		
Hemoglobin, g/dL	10.6	12
Platelets/mm ³	124,000	247,000
WBC/mm ³	8100	3200
Segmented neutrophils/mm ³	4000	1900
Monocytes/mm ³	1100	200
Lymphocytes/mm ³	2000	1600
Mast cell %	7	0
LDH, UI/L	360	418
Tryptase µg/L, norm < 15	351	23.2
Histamine nmol/L, norm < 700	14,314	52.1
BONE MARROW		
% mast cells on aspiration	70	NC
% mast cell on biopsy	90	48
PB PHENOTYPE		
% circulating c-Kit ⁺ cells	46	2
% circulating c-Kit ⁺ CD25 ⁺ cells	0.1	0
MUTATION	Dup (501,502)	Dup (501,502)
CARYOTYPE	46, XX	46, XX

Figure legends

Figure Title: Peripheral blood and bone marrow findings at baseline and after 3 months of treatment with masitinib.

(A) **a:** Circulating dysmorphic mast cell (MC) in peripheral blood smear; **b:** dysmorphic MC in bone marrow smear; May Grunwald Giemsa, 1000 x (B) Sequence of mutated *c-Kit* with a duplication of six nucleotides dup(501-502). (C) Hypercellular bone marrow infiltrated by dysplastic MC occupying approximately 90% marrow cellularity; Hematoxylin and eosin, 20 x (C.a). The majority of MC are highlighted by c-Kit antibody; c-Kit, 40 x (C.b). The post treatment bone marrow shows a decrease in MC infiltration, occupying only 40% marrow cellularity; Hematoxylin and eosin, 20 x (C.c) as well as a decrease in c-Kit positive MC; c-Kit, 20x (C.d). (D) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) phenotype: dot plot showing 42% c-Kit⁺CD34⁺ cells (D.a) with only 0.1% of CD25⁺ cells (D.b). After treatment, there is a dramatic decrease of c-Kit⁺CD34⁺ cells, representing only 2% of circulating cells (D.c) without CD25⁺ cells (D.d).

(E) *Ex-vivo*: immunoblotting of cell lysates: control PBMC and patient's PBMC before treatment lysates were used after 7 days of culture with or without SCF. Untransfected Cos cells or dup⁵⁰¹⁻⁵⁰² transiently transfected Cos cells were stimulated with or without SCF as control. Tyrosine phosphorylation of KIT was analyzed by Western blotting using a rabbit anti-Phospho KIT antibody. (F and G) *In-vitro* effect of masitinib on ligand-independent activity of mutant KIT. Western blot analysis of either untransfected COS cells, or transiently transfected COS with human ^{WT}*c-Kit* (F) or dup⁵⁰¹⁻⁵⁰²*KIT* (G). Cells were serum starved for 3h and treated for 5 min with (+) or without (-) 250 ng/mL recombinant SCF. Tyrosine phosphorylation of KIT was analyzed as described above. (H) Proliferation of the patient's PBMC expressing mutant KIT: before treatment (upper panel); Ba/F3 control cells cultivated either with IL3 (center panel) or SCF (lower panel). Cells expressing WT or mutant KIT were plated in 96-well plates and grown for 48h with RPMI 10 with or without 0.1% conditioned medium from X63-IL-3 cells (*IL-3*) or 250 ng/mL SCF. Cell growth was assessed by

measuring mitochondrial conversion of WST-1 into blue formazan dye with a spectrophotometer after 7h. Experiments were done in triplicate.

KIT mutant inhibition: relevance in diagnostic of systemic mastocytosis.

Houcine Bougherara*, **Sophie Georgin-Lavialle***, Gandhi Damaj, Jean-Marie Launay, Ludovic Lhermitte, Christian Auclair, Michel Arock, Patrice Dubreuil, Olivier Hermine, Marie-Alix Poul.

*copremiers auteurs

En révision au British Journal of Haematology.

Introduction: La mastocytose systémique est une néoplasie myéloïde hétérogène comportant plusieurs formes avec des degrés d'agressivité variables. La plupart des adultes ont des mutations D816V sur le gène *c-Kit* codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase KIT. H. Bougherara a précédemment rapporté que la mutation D816V de *c-Kit* induit une activation constitutive et une localisation intracellulaire anormale de KIT et que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase entraîne la relocalisation de KIT à la surface de la cellule. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de l'activité kinase de KIT par un inhibiteur de tyrosine kinase, le Dasatinib, entraînant une accumulation du récepteur à la surface des cellules et pourrait constituer un marqueur diagnostic utile *in vitro* sur des prélèvements biologiques de patients atteints de mastocytose systémique.

Méthodes : Nous avons testé cette hypothèse sur 28 patients ayant un diagnostic prouvé de mastocytose systémique qui étaient porteurs ou non de la mutation de D816V et présentaient différentes formes cliniques de mastocytose. Les prélèvements étaient de la moelle osseuse ou des cellules mononuclées du sang périphérique. L'étude a été réalisée par cytométrie en flux.

Résultats: L'expression de KIT à la surface des cellules induite par le dasatinib est significativement augmentée en présence de la mutation D816V de *c-Kit*. Ces résultats sont corrélés au degré d'agressivité de la mastocytose aussi bien dans les échantillons de moelle osseuse que ceux de sang périphérique.

Discussion/Perspectives

Nos résultats démontrent pour la première fois que les mutants oncogéniques de c-Kit rencontrés au cours de la mastocytose peuvent se relocaliser à la surface de la cellule après inhibition de leur activité tyrosine kinase *in vivo*.

Nous montrons que le diagnostic de mastocytose systémique pourrait bénéficier d'un traitement des échantillons par un inhibiteur de tyrosine kinase comme le Dasatinib afin d'améliorer la sensibilité de détection de KIT en surface par cytométrie en flux. Cette technique pourrait être utile au diagnostic positif rapide de la mastocytose.

Grâce à cette technique, un prélèvement sang périphérique pourrait être utilisé à la place de l'aspiration médullaire par myélogramme afin d'aider au diagnostic positif de mastocytose, ce qui serait moins invasif et moins traumatisant pour le patient.

Cette technique pourrait aussi être intéressante pour surveiller l'évolution au long cours des mastocytoses systémiques dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle.

KIT mutant inhibition: relevance in diagnostic of systemic mastocytosis



Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	BJH-2011-00227
Manuscript Type:	Short Reports
Date Submitted by the Author:	07-Feb-2011
Complete List of Authors:	<p>Bougherara, Houcine; CNRS - ENS Cachan - Université Paris 11, LBPA</p> <p>GEORGIN-LAVIALLE, Sophie; Hôpital Necker-Enfants malades - APHP - Université Paris V, Service d'hématologie adulte - CNRS UMR 8147</p> <p>Damaj, Ghandi; CHU, Hématologie</p> <p>Launay, Jean-Marie; Hôpital Lariboisière - APHP - Université Paris VII, Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire</p> <p>Lhermitte, Ludovic; Hôpital Necker-Enfants malades - APHP - Université Paris V, Laboratoire d'hématologie</p> <p>Auclair, Christian; CNRS - ENS Cachan - Université Paris 11, LBPA</p> <p>Michel, Arock; CNRS - ENS Cachan - Université Paris 11, LBPA</p> <p>Dubreuil, Patrice; INSERM - Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille - Institut Paoli-Calmettes - Université de la méditerranée, U891 Laboratoire de Signalisation, Hématopoïèse et Mécanisme de l'Oncogenèse</p> <p>Hermine, Olivier; Hôpital Necker-Enfants malades - APHP - Université Paris V, Service d'hématologie adulte - CNRS UMR 8147</p> <p>Poul, Marie-Alix; CNRS - ENS Cachan - Université Paris 11, LBPA</p>
Key Words:	SYSTEMIC MASTOCYTOSIS, KIT Mutations, Kit Cell Surface Detection, dasatinib, Flow Cytometry

Title: KIT mutant inhibition: relevance in diagnostic of systemic mastocytosis

Running title: Dasatinib increases oncogenic KIT mutant detection

Authors:

Houcine Bougherara^{1,*}, Sophie Georgin-Lavialle^{2,3,*}, Gandhi Damaj⁴, Jean-Marie Launay⁵, Ludovic Lhermitte⁶, Christian Auclair¹, Michel Arock¹, Patrice Dubreuil⁷, Olivier Hermine^{2,3}, Marie-Alix Poul¹.

Affiliations:

¹CNRS UMR 8113, Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan, France.

²Service d'Hématologie Adultes et centre de référence sur les mastocytoses, Hôpital Necker-Enfants malades; Université Paris Descartes, Paris, France.

³CNRS UMR 8147, Hôpital Necker-Enfants malades; Université Paris Descartes, Paris, France.

⁴Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire Hôpital Sud, Amiens, France.

⁵Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Hôpital Lariboisière, Université Paris VII, France.

⁶Laboratoire d'hématologie, Hôpital Necker-Enfants malades; Université Paris Descartes, Paris, France.

⁷Inserm U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Laboratoire de Signalisation, Hématopoïèse et Mécanisme de l'Oncogenèse, Centre de référence des mastocytoses, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.

Correspondence:

Houcine Bougherara

CNRS UMR 8113, Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson 94230 Cachan, France. E-mail:

Houcine_b@hotmail.com

* HB and SGL contributed equally to this work

Summary

Systemic mastocytosis (SM) is a heterogeneous disease characterized by mast cells accumulation in various organs, mainly bone marrow. Patients with SM frequently bear D816V mutation in the tyrosine kinase receptor gene *KIT*. We previously reported that this point mutation induced mislocalized constitutive activation of KIT and that inhibition of tyrosine kinase activity led to its relocalization to cell surface. Herein, we confirm these data *in vitro* in hematopoietic cells and *in vivo* in KIT positive cells from 28 patients with proven SM and assess its diagnostic values. We showed that the tyrosine kinase inhibitor dasatinib pre-treatment of patient's samples improves detection of malignant KIT positive cells. Our results suggest that increased cell surface KIT expression by dasatinib treatment correlates to disease's aggressivity.

Keywords: Systemic Mastocytosis, *KIT* mutation, Kit cell surface detection, dasatinib, tyrosine kinase inhibitors

Introduction

Systemic Mastocytosis (SM) is a rare and heterogeneous myeloid neoplasm characterized by mast cells (MCs) and their progenitor's accumulation in one or more organs besides skin involvement (Valent, *et al* 2003, Valent, *et al* 2001). Most adult patients with SM carry a D816V activating mutation in the tyrosine kinase receptor (TKR) KIT (Lanternier, *et al* 2008). Their MCs present CD2 and/or CD25's aberrant expression as well as decreased KIT expression (Escribano, *et al* 2001, Escribano, *et al* 2004, Valent, *et al* 2007, Valent, *et al* 2001). The role of Flow Cytometry analysis in the classification and diagnosis of mastocytosis was defined but requires the analysis of a large panel of immunophenotypic markers (Escribano, *et al* 2004, Teodosio, *et al* 2010).

KIT oncogenic mutations can induce ligand independent activation leading to uncontrolled MCs proliferation. We previously showed that *KIT* activating point mutations either in the juxtamembrane (V560G) or in the catalytic domain (D816V), induced mislocalized constitutive activation of KIT in non-hematopoietic cells. We further demonstrated that KIT catalytic inhibition with specific tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as dasatinib, a multikinase inhibitor, can inhibit KIT D816V activation and restore its cell surface localization (Bougherara, *et al* 2009).

Our objectives were to confirm these data *in vitro* in stable hematopoietic cell lines stably expressing KIT wt or the activating mutation D816V and *in vivo* among bone marrow (BM) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of SM patients. We evaluated this approach in BM and PB samples of 28 SM patients.

Design and methods

DNA constructs and cell lines

A cDNA fragment encoding human-*KIT* was cloned into the lentiviral vector pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (gift from Didier Trono, EPFL Lausanne, Suisse). Alternatively, D816V point mutation was generated (Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit; Clontech, USA). The Flag or HA tag was inserted into WT *KIT* or D816V *KIT* constructs, respectively, at NH2 terminal extremity. Transduced Ba/F3 hematopoietic murine cells were selected for interleukin-3 independent growth and tag expression.

Patients, controls and samples

Twenty-eight patients with SM diagnosis as defined by the international consensus criteria (Valent P 2001) and 12 healthy controls were enrolled in a prospective national multicentric French study between 2007 and 2010. All patients provided informed consent. The study was approved by the ethical committee of Necker hospital, and was carried out in compliance with the precepts of the Helsinki protocol. SM subcategories included indolent (ISM; n=10) and aggressive forms of SM (n=18), including aggressive SM, mast cell leukemia (MCL) and SM associated to hematological non mast cell lineage disease (SM-AHNMD). The study population consisted of 17 men and 11 women (Table I). Median age at sample collection was 60 years [22-80]. *KIT* gene was fully sequenced for all patients. *KIT* D816V mutation was detected among 24 patients and four patients were *KIT* wt. Median serum tryptase level in serum was 163.3 mg/L.

PBMCs isolation

PB was collected by venipuncture in heparinized tubes. PBMCs were isolated by the standard Ficoll-Paque method (Amersham Life Science, U.K). Cells were washed twice in phosphate-

buffered saline containing 2% foetal bovine serum and cells were either frozen in liquid nitrogen in 10% dimethylsulfoxide or immediately immunostained.

Flow Cytometry immunophenotypic analysis

Fresh PB or BM samples were either single or double stained by a combination of APC conjugated anti-CD117/KIT (BD Biosciences, USA) and FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-FcR ϵ I (eBioscience, Inc. San Diego, USA) monoclonal antibodies after red cells lysis (FACS Lysing solution, BD Biosciences, USA), as described by Escribano's group (Escribano, *et al* 1998). Alternatively, cryopreserved samples containing PBMCs or BMMCs were used in place of fresh cells. Data acquisition was performed with a FACSCalibur Flow Cytometer and the CellQUEST software (BD Biosciences). CD117-APC MFI were quantified on CD117-APC^{high} and FcR ϵ I^{high} positive gating. Data are compared on column dot-plots and *t*-test statistics are performed with Prism 5.00 (GraphPad Software, USA). Statistical comparisons between the characteristics of the different patient's subgroups were based on unpaired *t*-tests. All reported *p* values are two tailed with confidence intervals (CI) of 95%.

Dasatinib treatment

Hematopoietic BaF/3 cell lines expressing KIT WT or KIT D816V mutants were treated for 45 minutes with 100 nM dasatinib (Syngene international Pvt Ltd, Bangalore, India) and patient's PB and BM samples were treated for 2 hours with 1 μ M dasatinib before immunostaining.

Detection of KIT mutation and measurement of serum tryptase

The technique used for detection of KIT D816V mutation has been previously described (Bodemer, *et al* 2010). At sample collection, the serum level of total tryptase (protryptase + btryptase) was determined using a fluorescence enzyme-linked immunoassay (Unicap;

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Pharmacia). The detection limit of this assay is 1 ng/mL. Normal serum tryptase levels range between <1 and 15 ng/mL, with a median of ~ 5 ng/mL.

For Peer Review

Results and Discussion

In vitro Flow Cytometry analysis of KIT cell surface expression on BaF/3 cells stably expressing KIT WT showed that membrane localization of KIT is not affected by dasatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor. Conversely, on BaF/3 cells expressing KIT D816V, dasatinib induced a significant increase of KIT surface expression (Fig 1A), as quantified by the “ Δ MFI KIT factor” corresponding to the difference between mean fluorescence intensity with and without dasatinib cellular treatment. These results confirmed in hematopoietic models our previous observations acquired on CHO cells transiently expressing either WT, V560G, or D816V KIT mutants (Bougherara, *et al* 2009). Taken together, these results suggested that KIT detection by Flow Cytometry in SM diagnosis could be underestimated when mutant *KIT* surface expression is low and that kinase activity inhibition by dasatinib could improve the sensitivity of KIT mutant expressing cells in patients suffering from mastocytosis.

We collected samples from BM aspiration (n=9), PB (n=22) and spleen (n=1) from various patients (Table I) and analyzed KIT surface expression on FcR ϵ I^{high}/CD117^{high} double positive cells treated or not with dasatinib. The Δ MFI KIT factor was significantly higher in mutant KIT D816V positive group for both BM (fig 1B. left panel, $p<0.05$) and PB samples (fig. 1B right panel, $p<0.01$) as compared to the KIT WT group. This result confirms the aberrant localization of mutated *KIT* in SM patients. Dasatinib treatment enhanced mutated D816V *KIT* cells detection by restoring cell surface localization. However in D816V mutated *KIT* positive group, low Δ MFI KIT values correlated to the degree of SM aggressivity. Apart from classical methods such as gene receptor sequencing or RT-PCR that are applied on BM aspiration or skin biopsies we suggest that KIT detection by Flow Cytometry after dasatinib

1
2
3 treatment of PB samples could be an indirect tool to detect D816V *KIT* mutations. Thus, it
4
5 could represent a rapid, less invasive and labor-intensive approach to help the diagnosis.
6
7

8
9 Interestingly, the Δ MFI *KIT* factor was significantly higher among patients with aggressive
10
11 SM subcategories (ASM and SM-AHNMD) compared to benign subcategories (ISM) (Fig
12
13 1C. $p < 0.05$ and $p < 0.005$ respectively). Thus, the Δ MFI *KIT* factor could be a useful and
14
15 simple marker for the diagnosis of mastocytosis clinical forms and for the patient's follow up.
16
17 Determination of the Δ MFI *KIT* factor in a large series of mastocytosis patients or a long-
18
19 term follow-up of the Δ MFI *KIT* factor in ISM diagnosed patients could help to confirm its
20
21 prognostic value. Indeed, we can hypothesize that additional alterations in *KIT* structure may
22
23 impede dasatinib-mediated relocalization of the receptor. The absolute MFI value could also
24
25 be interesting to distinguish MCL from ASM by flow cytometry.
26
27

28
29 All together, these results show that the enhanced cell surface detection of *KIT* mediated by
30
31 its catalytic inhibition correlates with the presence of oncogenic mutations and with the
32
33 aggressivity of the mastocytosis.
34
35

36
37 Activating mutations in *KIT* and TKR closely related to *KIT* such as Flt3 and Met are
38
39 involved in many malignant diseases such as GIST, AML, small cell lung carcinomas (SCLC)
40
41 and germ cell tumors (for a review see Lennartsson J (Lennartsson, *et al* 2005)). We and other
42
43 groups showed that constitutive activation of *KIT* could induce an aberrant localization of the
44
45 mutant receptor (Bougherara, *et al* 2009, Choudhary, *et al* 2009, Tabone-Eglinger, *et al*
46
47 2008). We now provide evidence that Flow Cytometry based diagnosis in altered TKR related
48
49 disease could be improved by treating samples with TKIs before their analysis especially
50
51 when receptor expression is low on the cell surface. It may be useful as a prognostic tool and
52
53 to follow patients under TKI based therapy.
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments:

We thank Isabelle Hirsch, Catherine Grandpeix-Guyodo, Vahid Asnafi for their advices and Frédéric Subra, Katia Hanssens for technical assistance.

Funding

H. B is supported by the French Ministère de l'Education Nationale, de la recherche, et de la Technologie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

S. G-L is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

O.H. is supported by funds from Canceropole Ile de France and Institut National du Cancer.

PD is supported in part by funds from the following: INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale); la Ligue Nationale Contre le Cancer "équipe labellisée"; and Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (PD and OH)

Authorships:

H. B co-designed the study, co-wrote the manuscript, performed experiments, analyzed and interpreted data.

S. G-L co-designed the study, co-wrote the manuscript, collected samples, analyzed and interpreted data.

M.-A P helped design the study, analyzed and interpreted data and assisted in writing the manuscript.

O. H helped design the study, recruited patients, analyzed and interpreted data and assisted in writing the manuscript.

P. D, J-M. L, M. A, L. L, and C. A carried out experiments and assisted in writing the manuscript.

G.D recruited patients and assisted in writing the manuscript.

Disclosure conflict:

None

For Peer Review

References:

- Bodemer, C., et al. (2010) Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*, **130**, 804-815.
- Bougherara, H., et al. (2009) The Aberrant Localization of Oncogenic Kit Tyrosine Kinase Receptor Mutants Is Reversed on Specific Inhibitory Treatment. *Mol Cancer Res*.
- Choudhary, C., et al. (2009) Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell*, **36**, 326-339.
- Escribano, L., et al. (2001) Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leuk Res*, **25**, 563-570.
- Escribano, L., et al. (2004) Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom*, **58**, 1-8.
- Escribano, L., et al. (1998) Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood*, **91**, 2731-2736.
- Lanternier, F., et al. (2008) Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS One*, **3**, e1906.
- Lennartsson, J., et al. (2005) Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*, **23**, 16-43.
- Tabone-Eglinger, S., et al. (2008) KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*, **14**, 2285-2294.
- Teodosio, C., et al. (2010) Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, **125**, 719-726, 726 e711-726 e714.
- Valent, P., et al. (2007) Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*, **37**, 435-453.
- Valent, P., et al. (2003) Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol*, **122**, 695-717.
- Valent P, H.H.-P., Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB et al. (ed.) (2001) *Mastocytosis (Mast cell disease). World Health Organization (WHO) Classification of tumours*. IARC Press, Lyon, france.
- Valent, P., et al. (2001) Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*, **25**, 603-625.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure and Table Legends:

Table I. Major characteristics of the patients studied.

Abbreviations: WHO: World Health Organization, BM: Bone Marrow, PB: Peripheral Blood, M: Male, F: Female, SM: Systemic Mastocytosis, ASM: Aggressive SM, ISM: Indolent SM, SM-AHNMD: SM with associated hematological non mast cell lineage disease, CT: control, na: not available.

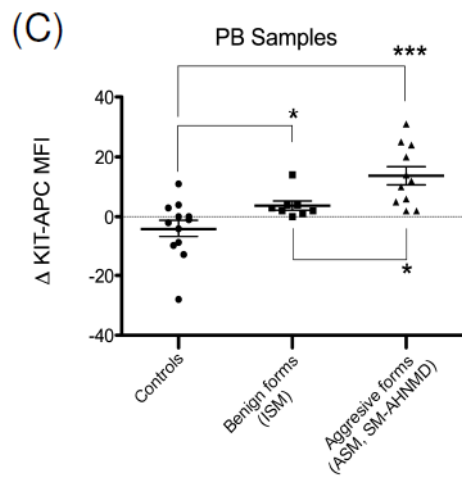
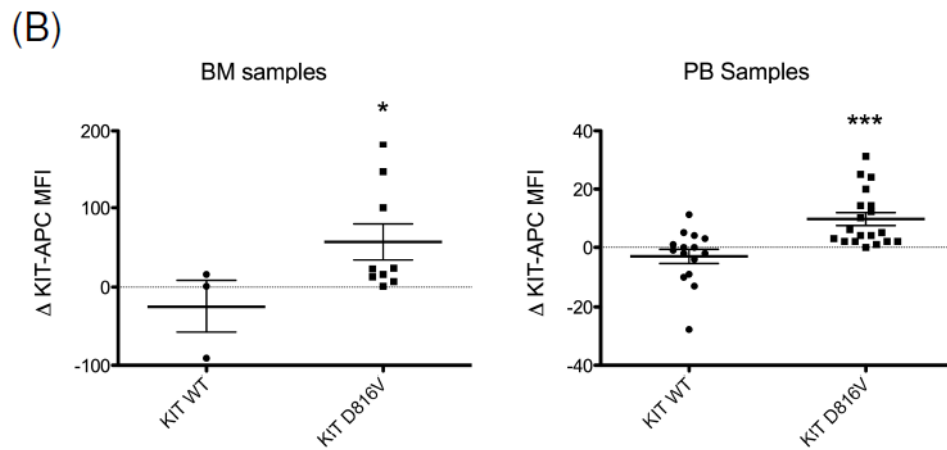
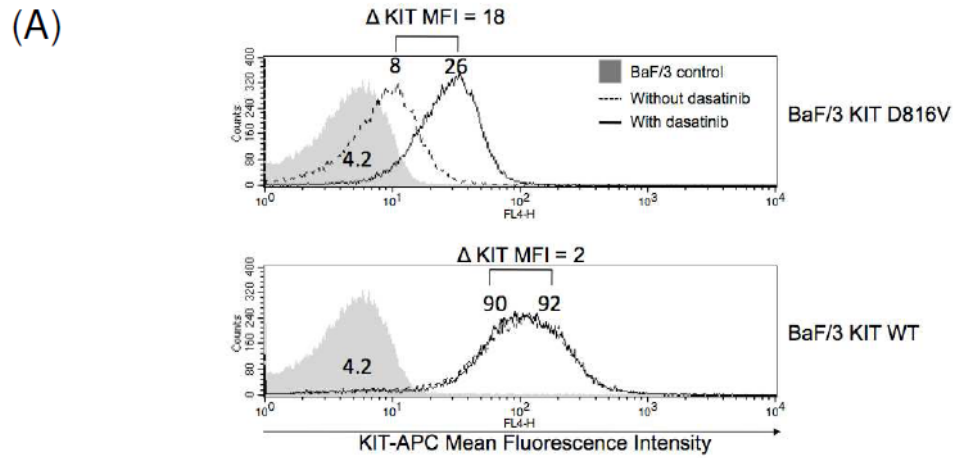
Fig 1. Dasatinib restores cell surface expression of mislocalized KIT D816V mutant.

(A) BaF/3 hematopoietic cells stably expressing either human KIT WT or human KIT D816V were analyzed for KIT cell surface expression by Flow Cytometry. Grey filled histogram curves represent KIT-APC MFI of dasatinib treated BaF/3 control cells. Dash and continue lined histogram curves represent KIT-APC MFI without and with dasatinib treatment, respectively. The Δ MFI KIT factor (Δ MFI KIT = KIT APC MFI with dasatinib – KIT APC MFI without dasatinib) corresponds to the difference between mean fluorescence intensities with and without dasatinib treatment.

(B) The Δ MFI KIT factor was assessed by Flow Cytometry in KIT WT control group versus KIT D816V positive SM group of patients from BM samples (right graph) and PB samples (left graph). * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs control.

(C) The Δ MFI KIT factor was assessed by Flow Cytometry among mutant KIT D816V positive group into KIT WT control group versus patients with benign (ISM) and aggressive systemic mastocytosis (ASM, SM-AHNMD) from PB samples. ISM Δ MFI KIT factor was significantly lower than ASM and SM-AHNMD * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Patient's number	Cells origin	Ficoll	Cells conservation	<i>KIT</i> status	Age at collection	Sex	WHO classification	Serum tryptase (µg/L)
1	BM	Yes	Frozen	WT	53	M	ASM	200
2	BM	Yes	Frozen	D816V	54	M	ASM	51.9
3	BM	Yes	Frozen	D816V	60	F	ASM	31
4	BM	Yes	Frozen	D816V	45	M	ASM	19
4	BM	No	Fresh	D816V	45	M	ASM	19
4	BM	Yes	Fresh	D816V	45	M	ASM	19
5	BM	Yes	Fresh	D816V	70	M	ISM	43
5	BM	Yes	Frozen	D816V	70	M	ISM	43
6	BM	Yes	Frozen	D816V	66	F	MCL	793
7	BM	Yes	Frozen	D816V	69	M	ISM	137
8	BM	Yes	Fresh	D816V	22	F	ISM	18.6
9	BM	Yes	Fresh	D816V	45	F	ISM	130
10	Spleen	Yes	Frozen	D816V	42	M	ASM	200
11	PB	Yes	Frozen	WT	70	M	ASM	330
12	PB	Yes	Frozen	WT	75	M	ASM	199
13	PB	Yes	Frozen	WT	48	F	ISM	280
14	PB	Yes	Frozen	D816V	57	M	ASM	150
15	PB	Yes	Frozen	D816V	69	M	ASM	304
16	PB	Yes	Frozen	D816V	73	M	ASM	156
17	PB	Yes	Frozen	D816V	80	F	ASM	30
4	PB	No	Fresh	D816V	45	M	ASM	19
18	PB	Yes	Frozen	D816V	74	M	SM-AHNMD	98
19	PB	Yes	Frozen	D816V	74	M	SM-AHNMD	800
20	PB	Yes	Frozen	D816V	79	M	SM-AHNMD	6
21	PB	Yes	Frozen	D816V	80	M	SM-AHNMD	200
22	PB	Yes	Frozen	D816V	60	M	SM-AHNMD	152
23	PB	Yes	Frozen	D816V	27	F	ISM	8
5	PB	Yes	Fresh	D816V	70	M	ISM	43
24	PB	Yes	Fresh	D816V	53	F	ISM	34
25	PB	Yes	Fresh	D816V	55	F	ISM	5
26	PB	Yes	Frozen	D816V	35	F	ISM	100
26	PB	No	Fresh	D816V	36	F	ISM	100
26	PB	Yes	Fresh	D816V	37	F	ISM	100
8	PB	Yes	Fresh	D816V	22	F	ISM	18.6
9	PB	Yes	Fresh	D816V	45	F	ISM	130
27	PB	Yes	Frozen	D816V	58	M	ISM	45
28	PB	No	Fresh	D816V	76	F	ASM	52
CT 1	PB	Yes	Fresh	WT	70	F	control	3
CT 1	BM	Yes	Fresh	WT	70	F	control	3
CT 2	BM	Yes	Fresh	WT	30	F	control	4
CT 2	PB	Yes	Fresh	WT	30	F	control	4
CT 3	PB	Yes	Fresh	WT	79	M	control	na
CT 4	PB	Yes	Fresh	WT	59	M	control	na
CT 5	PB	Yes	Fresh	WT	62	F	control	na
CT 6	PB	Yes	Fresh	WT	32	M	control	na
CT 7	PB	Yes	Fresh	WT	86	F	control	na
CT 8	PB	Yes	Fresh	WT	65	F	control	na
CT 9	PB	Yes	Fresh	WT	53	M	control	na
CT 10	PB	Yes	Fresh	WT	82	F	control	na
CT 11	PB	Yes	Fresh	WT	30	F	control	na
CT 12	PB	Yes	Fresh	WT	30	M	control	na



Revues

Mise au point

Actualités sur la compréhension et le traitement des mastocytoses systémiques

Current concepts and treatment advances in systemic mastocytosis

S. Georgin-Lavialle^a, S. Barete^b, F. Suarez^a, Y. Lepelletier^a,
C. Bodemer^c, P. Dubreuil^d, O. Lortholary^e, O. Hermine^{a,*}

^a Service d'hématologie adultes, CNRS-UMR 8147, centre de référence sur les mastocytoses, hôpital Necker-Enfants-Malades, université Paris-V, Paris, France

^b Département de dermatologie-allergologie et centre de référence sur les mastocytoses, hôpital Tenon, université Paris-VI, Paris, France

^c Département de dermatologie pédiatrique et centre de référence sur les mastocytoses, hôpital Necker-Enfants-Malades, université Paris-V, Paris, France

^d Inserm U159, institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

^e Service des maladies infectieuses et tropicales et centre de référence sur les mastocytoses, hôpital Necker-Enfants-Malades, université Paris-V, 75015 Paris, France

Disponible sur Internet le 10 avril 2008

Résumé

Propos. – Les mastocytoses sont des maladies rares, caractérisées par une prolifération anormale de mastocytes dans différents tissus ou organes. Les manifestations cliniques résultent de la dégranulation des mastocytes ou de leur infiltration tumorale. Les mastocytoses systémiques peuvent s'associer à des hémopathies et leur pronostic est variable : elles peuvent être asymptomatiques pendant des années, puis devenir très agressives et rapidement mortelles. Les formes pédiatriques régressent en général à l'adolescence contrairement aux formes de l'adulte qui ne régressent pas. Jusqu'à récemment, le traitement de cette maladie incurable était uniquement symptomatique.

Actualités et points forts. – Des progrès récents ont été faits dans la compréhension de la physiopathologie de ce syndrome myéloprolifératif qui est la conséquence d'une mutation activatrice du récepteur du *stem cell factor* (SCF) : C-Kit détectable dans les mastocytes et leurs progéniteurs. Plusieurs mutations ont été mises en évidence et la plus fréquente est la D816V. Les voies de transductions spécifiques de ces mutations ont également été étudiées. Le diagnostic de mastocytose n'est donc plus seulement histologique, mais repose également sur des techniques d'immunologie, d'immunohistochimie ou de biologie moléculaire.

Perspectives et projets. – Les avancées physiopathologiques ont permis le développement de nouveaux traitements visant à inhiber directement les voies de prolifération des mastocytes comme les inhibiteurs de tyrosine kinase et la rapamycine.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Purpose. – Mast cell disorders are defined by an abnormal accumulation of tissue mast cells in one or more organ systems. Clinical symptoms in mastocytosis result from mast cells derived mediators and, less frequently, from destructive infiltration of mast cells. Systemic mastocytosis is regressive among children, whereas the disease is persistent among adults. A clonal haematological non-mast cell lineage disease can be associated. The clinical course in these patients is variable ranging from asymptomatic for years to highly aggressive and rapidly devastating. Until recently, the only treatment of this incurable disease was symptomatic.

Current knowledge and key points. – Recent advances were done in understanding the physiopathology of this myeloproliferative syndrome which results from an activating mutation of the stem cell factor receptor: C-Kit. A somatic C-Kit mutation is usually detectable in mast cells and their progenitors. Different mutations were found and the mutation D816V is the most frequent. Their specific transduction paths were also studied. Diagnosis of systemic mastocytosis does not only rest upon pathological examination but also on molecular as well as immunological and immunochemical tools.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hermine@necker.fr (O. Hermine).

Future prospects and projects. – Physiopathological advancements led to suggest new treatments in order to directly inhibit proliferative paths of mast cells such as tyrosine kinase inhibitors and rapamycin.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Mastocytose ; C-Kit ; D816V ; Traitement ; Rapamycine

Keywords: Mastocytosis ; C-Kit ; D816V ; Treatment ; Rapamycin

1. Introduction

Les mastocytoses sont des maladies rares. On distingue classiquement les formes cutanées pures (90 %) et les formes systémiques (10 %). En 2006, en France 1300 cas de mastocytose ont été recensés par l'association française pour les initiatives de recherche sur le mastocyte et les mastocytoses (Afirmm). Les formes systémiques sont caractérisées par une accumulation anormale de mastocytes au sein de différents organes et, en particulier de la moelle osseuse. Les manifestations cliniques sont variables [1,2], soit en rapport avec la libération de médiateurs mastocytaires, soit la conséquence d'une infiltration tumorale. L'aspect clinique protéiforme et la variabilité de l'évolution ont conduit à de nouvelles classifications et à de nouvelles recommandations thérapeutiques. De nombreux progrès sur l'origine des mastocytoses ont été réalisés durant la dernière décennie. Les études moléculaires ont, en effet, démontré que les mastocytoses au moins chez l'adulte pouvaient être en fait assimilées à des syndromes myéloprolifératifs. La mise en évidence d'une mutation de C-Kit chez la plupart des patients présentant une forme sporadique de mastocytose suggère un rôle essentiel de cette tyrosine kinase dans l'origine de la maladie et permet d'espérer de nouvelles voies thérapeutiques ciblées. Les aspects physiopathologiques et thérapeutiques récents sont discutés dans cette mise au point.

2. Physiopathologie

Le *stem cell factor* (SCF) est la principale cytokine impliquée dans la mastocytose. C-Kit (CD117) est son récepteur : il s'agit d'un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des tyrosine-kinases (Fig. 1). Les mastocytes sont les seules cellules hématopoïétiques qui expriment C-Kit tout au long de leur différenciation. C-Kit comporte un domaine kinase 1 juxtamembranaire, site de liaison de l'ATP, et un domaine kinase 2, site de l'activité phosphotransférase. La liaison du SCF à C-Kit provoque sa dimérisation et sa phosphorylation. Il s'ensuit une activation des voies Ras-Map kinase, Src kinase, STAT et PI3 kinase/AKT, permettant la migration, la prolifération, la survie et l'activation des mastocytes [3].

Les mutations de C-Kit sont à l'origine des mastocytoses [4,5]. La présence de mutations activatrices de C-Kit entraîne une autophosphorylation à l'origine de la différenciation, migration et de l'accumulation de mastocytes dans les différents tissus [6–8]. La mutation D816V (la plus fréquente) est détectée chez environ 70 % des adultes atteints de mastocytose systémique. Une étude espagnole a retrouvé dans la moelle osseuse de patients atteints de mastocytose indolente ou agressive une prévalence de cette mutation de 93 % [9]. En France, l'Afirmm a

récemment étudié la fréquence de la mutation D816V dans la peau et la moelle : elle existe dans 85 % des cas des formes systémiques et 70 % des formes cutanées pures. Cette fréquence n'est pas augmentée dans les formes agressives. D'autres mutations situées au niveau de la zone catalytique sont plus rares : codon 816 (Asp816Tyr, Asp816Phe, Asp816His) et aboutissent également à une activation constitutive du récepteur. Une mutation, sur le codon 839 (Glu839Lys) a été décrite dans de très rares formes pédiatriques [10] et inhibe le récepteur ce qui pour certains pourrait expliquer les régressions spontanées observées en pédiatrie. Elle n'a pas été retrouvée par d'autres groupes et pourrait correspondre à un polymorphisme. Sur le codon 820, une mutation Gly820Val, a été décrite dans un seul cas de leucémie à mastocytes [11]. Rarement des mutations dans le domaine juxtamembranaire de C-Kit sont aussi décrites : Val560Gly, Phe522Cys, Asp509Tyr [12–14]. Toutes ces mutations sont également capables d'activer C-Kit de façon constitutive. L'imatinib mésylate permet de bloquer l'autophosphorylation induite par ces mutations juxtamembranaires, alors que ce produit est inactif en présence d'une mutation de la zone catalytique comme la D816V. On peut observer des tableaux cliniques variables pour une même mutation de C-Kit, ce qui suggère que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques que ces mutations jouent un rôle dans la pathogénie de la maladie. Bien que les mutations de C-Kit associées à la mastocytose soient dans la plupart des cas somatiques, un cas de délétion du codon 419 dans le domaine extramembranaire de C-Kit a été récemment rapporté dans une famille où coexistaient tumeur digestive de type stromal et mastocytose [15]. Plus récemment, une mutation F522C dans la région transmembranaire du récepteur a été également décrite.

Selon une analyse préliminaire des familles dans lesquelles au moins deux membres sont atteints d'une mastocytose en France, moins de 50 % des cas sont associés à une mutation en position 816 (Afirmm, données non publiées). De façon surprenante, certains membres d'une même famille présentent une mutation D816V et d'autres pas, suggérant qu'il existe un autre facteur de susceptibilité à la survenue d'une mastocytose et que dans ces cas la mutation de C-Kit est un événement secondaire.

Dans les formes pédiatriques, la plupart des études ne retrouvent la mutation D816V que de façon minoritaire. Sa présence serait associée aux formes systémiques. Ainsi il était couramment admis que chez l'enfant, à la différence des formes de l'adulte, la maladie n'était pas clonale et non liée à des mutations de C-Kit, mais que l'accumulation mastocytaire était plus réactionnelle pouvant expliquer sa régression dans un grand nombre de cas. En fait, une étude récente en étudiant la séquence de tous les exons de C-Kit, menée en France (C. Bodemer, O. Hermine, P. Dubreuil, Afirmm, résultats non publiés) sur plus de 50 patients pédiatriques montre que la

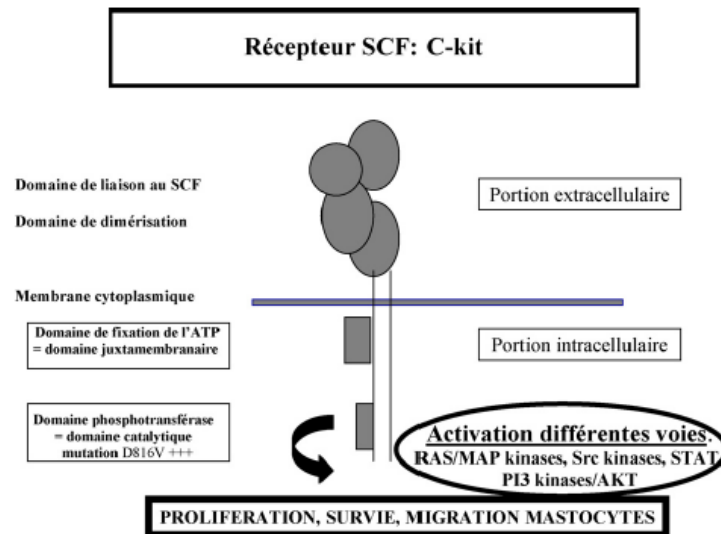


Fig. 1. Schéma du récepteur C-Kit.

plupart des mastocytoses de l'enfant présentent des mutations de C-Kit (>85%). La présence de ces mutations ne semble pas être corrélée au tableau clinique. Un suivi prospectif permettra de déterminer si certaines d'entre elles sont associées à la régression de la maladie. De façon intéressante elles sont localisées dans les exons 8, 9 (codant pour la région extracellulaire) et dans les exons 10, 11 (codant pour la région transmembranaire). Elles induisent comme la mutation D816V une autophosphorylation du récepteur, mais semblent entraîner des cascades de phosphorylations en intracellulaires différentes de celles de la mutation D816V. Dans l'avenir, il restera à comprendre par quel mécanisme les mastocytoses pédiatriques, qui sont en fait des tumeurs clonales, régressent à l'adolescence.

3. Manifestations cliniques

Les signes cliniques [2,16] des mastocytoses sont la conséquence de la dégranulation mastocytaire et/ou de l'infiltration tumorale. Les manifestations associées à la dégranulation mastocytaire sont paroxystiques, de survenue spontanée ou déclenchée par des stimuli variés. Il s'agit essentiellement de flushs associés ou non à des manifestations cardiaques (pouvant aller jusqu'à la syncope) et/ou pulmonaires et/ou à un prurit. Une cystite interstitielle avec pollakiurie est fréquente. Une ostéopénie, voire ostéoporose pourrait aussi résulter de la libération de médiateurs. Les manifestations liées à l'infiltration tumorale sont souvent cutanées : urticaire pigmentaire (macules ou maculopapules rouge violacées ou brun-beige prédominant sur le tronc) avec signe de Darier pathognomonique (turgescence des éléments après frottement). Les manifestations extracutanées comportent une infiltration médullaire (pouvant perturber l'hémogramme), un syndrome tumoral (avec hépatosplénomégalie, conséquence d'une infiltration par des mastocytes tumoraux ou d'une hémopathie associée à la mastocytose), une atteinte digestive (ulcères, inflammations de la muqueuse gastroduodénale, diarrhée) ou très rarement une infiltration pulmonaire.

Des signes généraux sont fréquemment observés, comme la fatigue parfois très handicapante et des douleurs diffuses ostéomusculaires, même sans lésion anatomique. Outre les manifestations classiques ci-dessus, ont été rapportés plus récemment de rares accidents vasculaires cérébraux [17], des atteintes cutanées diffuses [18], des insuffisances cardiaques par infiltration des trois tuniques du cœur [19]. Anxiété et dépression peuvent atteindre 20 % des patients [2], ainsi que des troubles marqués de l'attention et de la concentration (Afirmm, données non publiées). Parfois certains patients présentent des comportements agressifs paroxystiques. Une baisse de la libido est notée chez la moitié des patients.

Toutes ces manifestations cliniques sont hétérogènes et ressenties de façon très diverses d'un patient à un autre pour le même type d'atteinte. Ce ressenti est responsable d'un handicap parfois marqué ayant des conséquences socioprofessionnelles parfois dramatiques. Ainsi dans une étude récente de l'Afirmm (résultats non publiés) portant sur plus de 300 patients, 70 % d'entre eux s'estiment handicapés par leur maladie dont 25 % sévèrement. Ce handicap n'est pas corrélé à la masse mastocytaire, à l'agressivité de la maladie, au taux de tryptase sérique ni aux types de mutations de C-Kit. Ainsi des patients présentant une urticaire pigmentaire isolée s'estiment parfois davantage handicapés que des patients avec des formes agressives de la maladie.

Toutes ces manifestations cliniques sont hétérogènes et ressenties de façon très diverses d'un patient à un autre pour le même type d'atteinte. Ce ressenti est responsable d'un handicap parfois marqué ayant des conséquences socioprofessionnelles parfois dramatiques. Ainsi dans une étude récente de l'Afirmm (résultats non publiés) portant sur plus de 300 patients, 70 % d'entre eux s'estiment handicapés par leur maladie dont 25 % sévèrement. Ce handicap n'est pas corrélé à la masse mastocytaire, à l'agressivité de la maladie, au taux de tryptase sérique ni aux types de mutations de C-Kit. Ainsi des patients présentant une urticaire pigmentaire isolée s'estiment parfois davantage handicapés que des patients avec des formes agressives de la maladie.

4. Examens complémentaires

Le diagnostic formel de mastocytose s'établit sur des données histologiques, mais dans certaines formes sans atteinte cutanée,

ou avec des manifestations systémiques, des examens complémentaires sont nécessaires à la fois pour confirmer un diagnostic, établir un pronostic et définir la meilleure stratégie thérapeutique [20].

Le dosage de la tryptase sérique est pratiquement toujours supérieur à 20 ng/ml [21] chez les patients atteints de mastocytose systémique. Dans ce cas, il est corrélé à l'importance de l'infiltration mastocytaire, et plus particulièrement à l'infiltration médullaire [22]. Sa diminution peut être utilisée comme élément de suivi de l'efficacité thérapeutique [23,24]. L'élévation du taux de tryptase sérique fait partie des critères mineurs du diagnostic de mastocytose systémique [21]; néanmoins, un taux élevé ne signe pas une mastocytose et son élévation lors de réactions allergiques systémiques impose des contrôles répétés [22].

Les mastocytoses systémiques s'accompagnent d'une augmentation des *taux sériques de C-Kit (CD117) et de CD25 solubles* [25], paraissant également corrélée à la sévérité de la maladie et à l'importance de l'infiltration médullaire par les mastocytes anormaux.

L'examen cytologique et anatomopathologique de la moelle osseuse, permet d'affirmer l'existence d'une mastocytose systémique [26] et peut aussi révéler une hémopathie associée. Chez l'adulte, la biopsie ostéomédullaire (BOM) doit être réalisée en cas de doute diagnostique, de cytopénie associée ou en vue d'une inclusion dans un protocole thérapeutique. En dehors de ces contextes, dans notre expérience, elle n'apporte pas de bénéfice pour la prise en charge des patients. Chez l'enfant, seule une mastocytose cutanée diffuse, des dysfonctions d'organes ou des anomalies hématologiques doivent conduire à des explorations complémentaires. La réalisation de biopsies nécessite une technique rigoureuse et l'utilisation d'anesthésiques locaux non adrénalinés, la dégranulation étant facilement induite par des traumatismes ou certains agents physiques ou chimiques. Les prélèvements cutanés, réalisés sur des lésions non urticariennes et non traumatisées, sont fixés dans le formol; les biopsies médullaires ne sont pas décalcifiées. La mise en évidence d'infiltrats denses et multifocaux de mastocytes dans la moelle osseuse est un critère majeur du diagnostic de mastocytose systémique [27]. L'utilisation d'un marquage immunohistochimique par anticorps antitryptase est recommandée pour détecter soit des infiltrats extrêmement peu importants, soit des infiltrats composés de cellules mastocytaires immatures et non granuleuses [26]. La recherche des antigènes CD25, CD68, CD117 et CD2 par immunohistochimie peut aider au diagnostic [28], le CD2 et le CD25 étant spécifiquement détectables à la surface des mastocytes en cas de mastocytose systémique. Une aspiration médullaire et un frottis doivent compléter la biopsie car l'étude cytologique médullaire peut apporter des éléments cruciaux au diagnostic. Le pourcentage de mastocytes présents sur le frottis est un paramètre diagnostique et pronostique important [29]. Classiquement, le pourcentage de mastocytes médullaires, inférieur à 5 % dans les mastocytoses systémiques indolentes, augmente dans les formes agressives. Une corrélation inverse entre la survie du patient et le pourcentage de mastocytes médullaires a été établie [29]. La présence d'au moins 20 % de mastocytes sur le frottis médullaire conduit au diagnostic

Tableau 1
Protocole initial et de suivi des patients adultes avec mastocytose

Première visite
Examen clinique, recherche du signe de Darier, ou dermatographe, évaluation du handicap
Biopsie cutanée (chez l'adulte) avec recherche moléculaire
Réalisation d'un hémogramme, frottis sanguin, enzymes hépatiques, tryptase sérique
Ostéodensitométrie rachidienne
Pour les patients avec manifestations paroxystiques ou altération de l'état général ou tryptase élevée ou anomalies biologiques : myélogramme (avec caryotype et études moléculaires) et/ou biopsie ostéomédullaire, scanner thoraco-abdominal, radiographies des os longs
Pour les patients avec suspicion d'atteinte spécifique d'organe : endoscopie digestive avec biopsie, biopsie hépatique, scintigraphie médullaire selon les symptômes
Suivi régulier tous les 6 mois pour ceux avec atteinte systémique : suivi de l'extension cutanée et des symptômes de dégranulation, dégradation de la qualité de vie, autres atteintes d'organes
Selon résultats : suivi tous les 2–3 ans si stabilité avec ostéodensitométrie, échographie abdominale, tryptase, myélogramme et/ou BOM si anomalies biologiques et/ou organomégalie

D'après Hartmann K et Benz [34].

de leucémie à mastocytes [27,30]. L'étude cytologique doit être complétée par un phénotypage mastocytaire réalisé par cytométrie en flux, surtout en cas de doute diagnostique, on recourt alors à un panel d'anticorps dirigés contre le CD117, le CD2 et le CD25 [31,32].

On recherche par RT-PCR sur les cellules médullaires obtenues par aspiration la présence d'une mutation activatrice du C-Kit (généralement D816V), décelable majoritairement dans la moelle de patients avec mastocytose systémique [7]. On peut parfois retrouver la mutation sur les cellules du sang périphérique. Les autres mutations de C-Kit ne sont pas recherchées en routine. Certains auteurs proposent, en cas d'hyperleucocytose et/ou d'éosinophilie associées à la mastocytose, un dépistage des transcrits de fusion BCR-ABL et FIP1-PDGFR [33] pour éliminer les diagnostics de leucémie myéloïde chronique et de syndrome hyperéosinophilique qui peuvent s'accompagner d'une infiltration de mastocytes.

Les biopsies cutanées peuvent aider au diagnostic dans les formes où la moelle est indemne. La recherche d'une mutation D816V est couramment réalisée sur les échantillons de peau, sa sensibilité étant, dans notre expérience, supérieure à celle de la moelle (Affirm, données non publiées).

5. Évaluation tumorale et recherche d'une hémopathie associée

Le diagnostic posé, on évalue le retentissement de l'infiltration tumorale et on élimine une hémopathie associée [1]. Hartmann et Henz proposent une démarche diagnostique adaptée aux symptômes [34] (Tableau 1). En présence d'une hyperéosinophilie à l'hémogramme, on éliminera un syndrome hyperéosinophilique associé à un infiltrat mastocytaire médullaire. Dans ce cas, la morphologie des mastocytes médullaires est normale, la mutation D816V absente, et dans

40 % des cas le transcript de fusion FIP1-PDGFR α existe [35].

L'infiltration médullaire peut s'accompagner de cytopénies d'origine multiple : thrombopénies centrales et périphériques, pancytopenies par envahissement médullaire, myélofibrose et/ou hypersplénisme en cas de splénomégalie. Les cytopénies peuvent être associées à une myélodysplasie d'emblée ou au cours de l'évolution. Des syndromes myéloprolifératifs ou frontiers peuvent exister. Polyglobulie et thrombocytose sont rares et impliquent d'éliminer une cause secondaire ou primitive associée à la mutation de JAK2 [35]. Dans les formes sans atteintes cutanées, le diagnostic différentiel avec une myélofibrose primitive peut être difficile, la recherche des mutations de C-Kit et de JAK2 [35] peuvent être utiles.

Selon qu'il existe ou non une atteinte spécifique d'organe avec une traduction clinicobiologique, Valent et al. décrivent des critères B (comme *borderline-benign*) ou C (comme *consider cytoréduction*), qui traduisent l'importance de l'infiltration mastocytaire et de ses éventuels retentissements (Tableau 2) [27]. Ils permettent de proposer une classification anatomoclinique des mastocytoses et aident à la décision thérapeutique.

6. Critères diagnostiques et classification OMS de 2001

En tenant compte des paramètres précédemment décrits, l'OMS a défini en 2001 les critères diagnostiques de mastocytose systémique. Si un critère majeur et un critère mineur, ou trois critères mineurs sont présents chez un patient, on peut retenir le diagnostic de mastocytose systémique [27]. Le critère majeur est défini par la présence d'infiltrats denses (supérieur à 15 mastocytes par agrégat confirmés par l'immunohistochimie ou les colorations spécifiques) et multifocaux de mastocytes dans une ou plusieurs biopsies d'organes en dehors de la peau (dans la plupart des cas la biopsie médullaire). Les critères mineurs comportent les éléments suivants :

- la présence de mastocytes atypiques de forme allongée ou de promastocytes dans la moelle (plus de 25 % des mastocytes) ;
- la présence de la mutation D816V dans un ou plusieurs organes (surtout au niveau médullaire) ;
- la coexpression du C-Kit (CD117) et du CD2 et/ou CD25 par les mastocytes médullaires, du sang ou d'autres organes ;
- l'élévation de la tryptase sérique au-dessus de 20 ng/ml (critère invalide s'il coexiste une hémopathie non mastocytaire).

Les mastocytoses constituent une entité très hétérogène faite de pathologies différant aussi bien par leur présentation que leur pronostic et leur traitement. Plusieurs classifications ont été proposées, dont la plus récente, établie par l'OMS, en 2001 (Tableau 3) [27,36]. Cette classification distingue les mastocytoses cutanées pures et parmi les mastocytoses systémiques : les mastocytoses indolentes, les mastocytoses associées à une hémopathie maligne non mastocytaire, les mastocytoses systémiques agressives, les leucémies à mastocytes, le sarcome mastocytaire et le mastocytome extracutané.

7. Pronostic

Il est hétérogène : chez l'enfant, le pronostic est le plus souvent favorable, avec une résolution spontanée des symptômes dans 50 % des cas à la puberté, mais certaines mastocytoses cutanées diffuses peuvent parfois être fatales [18]. Il n'existe pas de critères prédictifs de régression, mais la présence d'une mutation de C-Kit en dehors de l'exon 17 serait associée à une probabilité de régression spontanée à l'adolescence. Chez l'adulte, le pronostic est conditionné par la présence d'une autre hémopathie : la survie à cinq ans est de 61 % en absence d'hémopathie et de 28 % dans le cas contraire, avec une survie médiane de 1,2 an [2]. Il semblerait qu'en absence d'hémopathie associée, l'importance de l'infiltration médullaire mastocytaire et éosinophile, le taux des PAL et le taux circulant de C-Kit soluble soient les principaux facteurs pronostiques [37].

Contrairement aux études initiales la présence de la mutation D816V de C-Kit ne semble pas être associée à un pronostic péjoratif (Afirmm données non publiées) : d'autres facteurs génétiques seraient associés au risque de développer une forme agressive. Au total, la survie des patients avec mastocytose systémique est globalement identique à celle de la population générale, mais leur qualité de vie est altérée. Ce sont les sujets avec une forme agressive ou leucémisée, soit 5 % environ des patients ayant une mastocytose systémique, qui ont une survie diminuée. Dans 20 ans, grâce au recueil de données prospectif mené par l'Afirmm, des données plus précises seront disponibles.

8. Traitement

La mastocytose nécessite une adaptation thérapeutique à chaque profil de patient. Compte tenu de sa faible prévalence, le traitement est essentiellement fondé sur l'expérience et comporte deux grands axes [16]. Le premier vise à prévenir et à limiter la dégranulation et/ou ses conséquences ; c'était, jusqu'à très récemment, le seul traitement que l'on pouvait proposer. Le second a pour objectif de contrôler la prolifération tumorale mastocytaire. Les récents progrès accomplis dans la compréhension de la physiopathologie ont permis de nouvelles approches thérapeutiques, ainsi des inhibiteurs de tyrosine kinases sont en cours de développement afin d'inhiber l'activité tyrosine kinase de C-Kit et ainsi bloquer l'activation, la migration et la survie des mastocytes pathologiques.

Les nouvelles possibilités thérapeutiques dans les mastocytoses posent le problème du choix des médicaments en fonction du bénéfice clinique, pronostique et biologique qu'ils peuvent apporter et des risques iatrogènes qu'ils peuvent engendrer. À cet égard, la classification OMS des mastocytoses est utile mais n'est sans doute pas suffisante pour l'aide à la décision thérapeutique. Les formes leucémiques doivent bénéficier d'un traitement cytoréducteur du fait de leur mauvais pronostic. Les formes agressives devraient aussi bénéficier d'un traitement cytoréducteur pour préserver les organes envahis par les mastocytes. Enfin, les hémopathies associées devraient d'abord bénéficier d'un traitement spécifique de l'hémopathie. Il semble plus important d'évaluer avec le patient le handicap qu'il ressent

Tableau 2

Critères B et C (B : *borderline-benign* ; C : *consider cytoréduction*)

Signes B (infiltration mastocytaire sans dysfonction organique)	Signes C (dysfonction organique avec traduction clinicobiologique)	Défaillance d'organe
<p>Importante infiltration mastocytaire : infiltration > 30 % sur la BOM et taux de tryptase sérique > 200 ng/ml</p> <p>Dysmyélopoïèse : hypercellularité médullaire avec perte de cellules lipidiques. Discrets signes de myélodysplasie ou de myéloprolifération, mais NFS normale ou discrètement altérée sans aggravation progressive</p> <p>Organomégalie : hépatomégalie palpable sans ascite ou autre signe d'altération des fonctions hépatiques et/ou adénopathies palpables ou adénomégalies retrouvées à l'échographie ou au scanner et/ou splénomégalie sans hypersplénisme</p>	<p>Atteinte médullaire : PNN < 1000/mm³ et/ou Hb < 10 g/dl et/ou Pq < 100 000/mm³</p> <p>Atteinte hépatique : hépatomégalie palpable avec ascite, perturbation du bilan hépatique et/ou hypertension portale</p> <p>Atteinte splénique : splénomégalie palpable avec hypersplénisme Atteinte du tractus digestif : syndrome de malabsorption avec hypoalbuminémie et perte de poids Atteinte osseuse : ostéolyse et/ou ostéoporose sévère avec fractures pathologiques</p>	<p>Pancytopenie sévère et progressive : PNN < 500/mm³ avec des infections récurrentes. Nécessité de transfusions. Pq < 20 000/mm³ avec syndrome hémorragique</p> <p>Altération progressive des fonctions hépatiques, avec insuffisance hépatocellulaire jusqu'au coma</p>

D'après Valent P et al. [27]. Lorsque deux ou trois critères B sont remplis sans aucun critère C, on parle de mastocytose systémique de type indolente. BOM : biopsie ostéomédullaire ; NFS : numération formule sanguine ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; Hb : hémoglobine ; Pq : plaquettes.

pour définir la meilleure stratégie thérapeutique. Dans certaines circonstances si le handicap paraît important même si le pronostic vital n'est pas en jeu un traitement cytoréducteur peut être envisagé à mettre en balance avec les risques iatrogènes.

Les mesures générales et les traitements symptomatiques restent classiques, utilisant les antihistaminiques, le cromoglycate disodique [38], plus rarement l'aspirine, les antagonistes des récepteurs des leucotriènes [39]. Les bisphosphonates sous couvert d'une supplémentation adaptée en calcium et vitamine D, permettent, dans les cas d'ostéoporose sévère et fracturaire, une diminution des douleurs et une augmentation de la densité minérale osseuse rachidienne (Assous et al., soumis) [40]. La radiothérapie est uniquement proposée dans des formes tumorales et compressives. La PUVA-thérapie est controversée et est à éviter chez les sujets de phototype clair, compte tenu du risque carcinogène. La corticothérapie utilisée par voie locale ou générale a un effet souvent suspensif et majore le risque ostéoporotique. Les corticoïdes inhalés peuvent permettre un contrôle des symptômes dans la rhinite chronique et participer au traitement de fond du bronchospasme [16]. On peut, lors d'importantes crises douloureuses abdominales, utiliser le budésonide (Entocort[®], maximum 9 mg par jour) qui est faiblement absorbé, ce qui limite les effets indésirables. La corticothérapie générale peut aider au contrôle d'une malabsorption, d'une ascite [41] ou de crises douloureuses abdominales par poussées d'œdèmes. Instituée à la dose initiale de 1 mg/kg, sa décroissance doit être rapide.

Parmi les traitements cytoréducteurs, les chimiothérapies classiques même à fortes doses sont en général inefficaces. La mastocytose étant assimilée à un syndrome myéloprolifératif,

c'est par analogie avec le traitement de la leucémie myéloïde chronique que l'interféron a été essayé. Dans une étude rétrospective récente, 14 patients avec mastocytose agressive ont été traités par interféron, avec un taux de réponse majeur (disparition des critères C) de seulement 21 % [42]. L'efficacité de l'interféron a également été évaluée en prospectif dans une étude de phase II sur 20 patients (1 à 5 MU/m² 3 fois/semaine en sous-cutané) pendant six mois [23] ; on note sept réponses partielles et six mineures, avec rechutes précoces à l'arrêt du traitement. Mais, si l'infiltration médullaire reste la même, les paramètres biologiques sont améliorés, suggérant qu'un rôle de stabilisateur du mastocyte plus qu'une action antitumorale. L'interféron est mal toléré avec une fréquente aggravation des cytopénies ou un syndrome dépressif devant faire interrompre le traitement. Comme chez les patients traités pour l'hépatite C, la paroxétine (Deroxat[®]) permettrait d'en améliorer la tolérance neuropsychologique [43]. De même, l'utilisation concomitante de corticoïdes accentuerait son efficacité [39]. Ainsi on préconise l'utilisation de l'interféron dans les formes avec symptômes liés à la dégranulation.

La cladribine (2CdA) (Leustatine[®]) est un analogue nucléosidique utilisé notamment dans le traitement des leucémies à tricholeucocytes et qui a l'intérêt d'être actif sur des cellules qui ne sont pas en cycle. Deux observations de patients traités avec succès par la cladribine pour une mastocytose systémique ont été rapportés au début des années 2000 [24,44]. Une équipe a alors évalué son efficacité chez dix patients avec mastocytose systémique sévère [45]. Six cures de cladribine (0,10 à 0,13 mg/kg par jour en perfusion courte pendant cinq jours) à raison d'un cycle toutes les quatre à huit semaines, ont été administrées.

Tableau 3
Classification des mastocytoses (OMS 2001) et nouvelles formes

Catégorie	Critères diagnostiques	Pronostic
Mastocytose cutanée	Absence d'atteinte systémique Âge de survenue < 2 ans	Bon
Mastocytose systémique indolente	Pas d'argument en faveur d'une mastocytose systémique grave Âge de survenue > 2 ans Sous-type le plus fréquent chez l'adulte	Bon
Mastocytose <i>smoldering</i>	Infiltration Médullaire, tryptase > 200 ng/ml Pas de signe d'insuffisance d'organe (signes C) Dysmyélopoïèse, organomégalie (signes B) Signes cliniques évocateurs de dégranulation	
Syndrome d'activation mastocytaire monoclonal ou non	Pas d'amas mastocytaire, cellules CD25 positives/C-Kit positives Mutations C-Kit présente ou non	
Mastocytose systémique associée à une hémopathie maligne non mastocytaire	Classiquement associée à une MDS ou un SMP plus rarement associée à une LA ou un LNH	Celui de l'hémopathie associée
Mastocytose systémique agressive	Existence de signe témoignant d'une défaillance d'organe secondaire à l'infiltration mastocytaire (signes C) insuffisance médullaire insuffisance hépatique avec ascite splénomégalie avec hypersplénisme ostéolyses et fractures pathologiques atteinte du tractus digestif avec malabsorption et amaigrissement	Mauvais
Leucémie à mastocytes	Mastocytes atypiques (multilobulés, multinucléés) et > 10 % de mastocytes circulants ou > 20 % de mastocytes sur le myélogramme	Mauvais
Leucémies à mastocytes aleucémiques	Idem mais < 10 % mastocytes circulants	Mauvais
Sarcome mastocytaire	Tumeur maligne détruisant les tissus mous Atypie cellulaire mastocytaire ++	Mauvais
Mastocytome extracutané	Tumeur bénigne rare Cellules matures normales	Bon

Adapté de Akin et Metcalfe [36]. MDS : myélodysplasie. SMP : syndrome myéloprolifératif. LA : leucémie aiguë. LNH : lymphome non hodgkinien.

Le principal facteur limitant était la toxicité hématologique, sévère dans un tiers des cas. Bien qu'aucun patient n'ait eu de réponse complète, tous ont bénéficié d'une nette amélioration des symptômes associée à une diminution des marqueurs biologiques et de l'infiltration médullaire. Dans un cas de rechute 11 mois après l'arrêt du traitement, une nouvelle cure a permis d'obtenir une seconde rémission. Lortholary et al. ont confirmé en 2003, dans une étude multicentrique française, ces résultats sur 33 patients. Le 2CdA dans cette étude pouvait être utilisé par voie sous cutanée à domicile (Lytak®) (0,14 mg/kg) pendant cinq jours. Un taux de réponse majeur a été constaté dans 24 des 33 cas traités dans un délai moyen de quatre mois et pour une durée moyenne de 16 mois. La plupart des symptômes sont significativement améliorés incluant les troubles psychiatriques. Dans une autre étude portant sur quatre patients, la durée de rémission variait de deux mois à quatre ans [46]. Avec un recul de plus de cinq ans pour la majorité des patients, peu d'effets secondaires ont été observés, notamment hématologiques et liés à l'immunosuppression sous un traitement prophylactique par Bactrim® et Zelitrex®. Bien que l'efficacité sur les symptômes et l'infiltration soit parfois spectaculaire, des rechutes sont fré-

quemment observées. De nouvelles modalités d'administration avec des doses plus faibles en entretien sont à l'étude.

Par analogie avec les remarquables résultats obtenus dans les GIST, tumeurs stromales gastriques qui comportent également des mutations de C-Kit [47], l'efficacité de l'imatinib mésylate (Glivec®), inhibiteur de tyrosine kinase, a été testée dans les mastocytoses. Malheureusement, celles qui comportent des mutations du site catalytique de C-Kit lui sont naturellement résistantes [48]. C'est notamment le cas de la mutation D816V, la plus fréquente. En revanche, les mutations du domaine juxtamembranaire, plus rares, Val560Gly [13], Phe522Cys [12] et Asp509Tyr [14], sont sensibles à l'imatinib mésylate. Les formes avec délétion du codon 419 le seraient également [15]. Enfin, l'imatinib mésylate est efficace dans les mastocytoses avec hyperéosinophilie où il existe une mutation du gène de fusion FIP1L1-PDGFR [33]. D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase ayant fait la preuve de leur efficacité dans la leucémie myéloïde chronique, comme le nilotinib ou le dasatinib, sont à l'étude mais les résultats préliminaires montrent une amélioration partielle des symptômes. L'utilisation d'un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase très spécifique de C-Kit et dénué

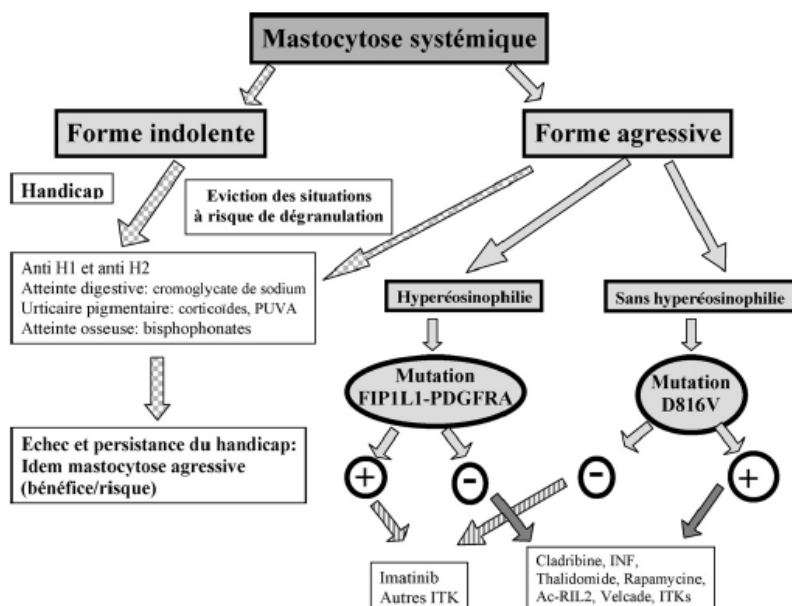


Fig. 2. Traitement proposé selon le type d'atteintes. D'après Tefferi et al. [51,59].

Mastocytose indolente : mastocytose systémique sans arguments en faveur d'une mastocytose systémique grave et âge de survenue supérieur à deux ans.

Mastocytose agressive : mastocytose systémique avec signes témoignant d'une défaillance d'organe secondaire à l'infiltration mastocytaire (signes C : insuffisance médullaire ; insuffisance hépatique avec ascite ; splénomégalie avec hypersplénisme ; ostéolyses et fractures pathologiques ; atteinte du tractus digestif avec malabsorption et amaigrissement). ITK : inhibiteur de tyrosine kinase ; INF : interféron ; RIL : récepteur interleukine.

de toxicité majeure, le masitinib est actuellement en cours de développement dans cette indication ; des résultats préliminaires montrent qu'il permet d'améliorer dans 50–60 % des cas les symptômes, notamment psychiatriques comme la dépression.

L'allogreffe de cellules souches a été évaluée chez des patients avec hémopathie associée [49,50]. Elle permet d'obtenir une rémission de l'hémopathie, mais pas de la mastocytose. On ne sait pas encore si c'est la réaction du greffon contre les mastocytes ou la cytoréduction qui permet le contrôle de la maladie.

Un schéma thérapeutique adapté aux différents types d'atteintes est résumé sur la Fig. 2 adaptée de Tefferi et Pardanani [51].

9. Perspectives thérapeutiques

Un certain nombre de nouvelles voies thérapeutiques sont en cours d'évaluation. De nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase, actifs sur la mutation D816V, sont à l'étude. Le composé OSI-930 permet dans des modèles murins de mastocytose une inhibition prolongée de Kit [52]. La *N*-benzoyl-staurosporine (PKC412) inhibe in vitro la prolifération mastocytaire [53] ; elle a été évaluée chez un patient atteint de leucémie à mastocyte associée à une myélodysplasie (SMD/SMP) [54]. Le tandutinib (MLN518) est un autre inhibiteur de tyrosine kinase, également inhibiteur de FLT3, qui inhibe in vitro la prolifération mastocytaire et permet d'induire une apoptose [55]. C'est une molécule peu toxique qui pourrait être un bon candidat

pour le traitement de la mastocytose systémique. Il est probable que de nouveaux inhibiteurs de C-Kit et de ces mutants soient développés dans un avenir proche. Leur spécificité, toxicité, et tolérabilité seront des éléments déterminants dans le futur qui pourront guider leur place dans cette maladie. D'autres voies de blocage de l'activation de C-Kit muté sont actuellement explorées : IMD-0354, qui inhibe NF-kappa-B, pourrait être actif sur les mastocytoses présentant une mutation de C-Kit de type D816V ou Val560Gly [56].

L'inhibiteur du protéasome, le Velcade® (Bortezomib, PS341) utilisé dans les myélomes pourrait être efficace en bloquant également la voie NF-kappa-B. La rapamycine ou sirolimus (Rapamune®) est un inhibiteur de mTOR, voie qui s'active en présence d'une mutation D816V [57]. De façon intéressante, à la différence de l'imatinib elle n'est active que dans les mutations de C-Kit de la région phosphotransférase, mais pas de la région juxtamembranaire. Elle pourrait être une alternative nouvelle au traitement des mastocytoses systémiques agressives ou avec handicap important et d'autres pathologies présentant la mutation D816V (leucémies aiguës myéloïdes, lymphomes NK). Du fait de ces propriétés antiangiogéniques le thalidomide a été utilisé avec succès chez deux patients avec des formes agressives de mastocytose [60]. Un protocole prospectif est actuellement en cours d'évaluation en France dans les formes agressives ou avec handicap. Ce médicament ainsi qu'un de ses dérivés moins neurotoxique le lenalidomide (Revlimid®) pourrait trouver une place intéressante dans le traitement des mastocytoses. Enfin, comme dans d'autres pathologies hématologiques les anticorps

monoclonaux ont été testés. En premier en tirant avantage de l'expression spécifique du CD25 par les mastocytes pathologiques des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD25 ou le denileukin difitox un dérivé de l'IL-2 couplé à la toxine diphtérique (Ontak®) ont été testés apparemment sans effet secondaire mais avec des résultats cliniques mineurs. L'omalizumab un anticorps anti IgE de souris humanisé (Zoller®), peut dans certains cas améliorer les chocs anaphylactiques associés à la mastocytose [58].

10. Conclusion

Les mastocytoses constituent un ensemble d'affections très hétérogène aussi bien par leur présentation clinique et biologique que par leur pronostic ou leur traitement. La récente découverte de l'existence de mutations de C-Kit et de leurs voies de transductions spécifiques a permis de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies et ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques visant à inhiber directement les voies de survie, migration et activation des mastocytes.

Remerciements

Afirmm, GIS maladies rares, ANR. Sophie Georgin-Lavialle bénéficie d'un financement par la fondation pour la recherche médicale (FRM).

Références

- [1] Fain O, Stürnemann J, Eclache V, Barete S, Casassus P, Hermine O, et al. Mastocytose systémique. *Presse Med* 2005;34(9):681–7.
- [2] Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Swce RG. Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1988;67(6):345–68.
- [3] Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(10):1053–74.
- [4] Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92(4):1736–44.
- [5] Tsujimura T. Role of c-kit receptor tyrosine kinase in the development, survival and neoplastic transformation of mast cells. *Pathol Int* 1996;46(12):933–8.
- [6] Akin C, Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(1):13–9, quiz 20.
- [7] Feger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127(2):110–4.
- [8] Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(23):10560–4.
- [9] Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108(7):2366–72.
- [10] Longley Jr BJ, Metcalfe DD, Sharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(4):1609–14.
- [11] Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, Jouault H, Imbert M, Vainchenker W, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol* 1997;96(2):374–6.
- [12] Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103(8):3222–5.
- [13] Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther* 2002;1(12):1115–24.
- [14] Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, et al. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis: in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 2006;30(4):373–8.
- [15] Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 2005;129(3):1042–6.
- [16] Marrache F, Memain N, Bonte I, Barete S, Casassus P, de Gennes C, et al. Traitement des mastocytoses systémiques. *Rev Med Interne* 2003;24(9):594–601.
- [17] Larroche C, Chadenat ML, Chaunu MP, Abad S, Casassus P, Dhote R. Accident vasculaire cérébral sur dissection artérielle au cours des mastocytoses systémiques: une association non-fortuite ? À propos de deux cas. *Rev Med Interne* 2005;26(10):820–3.
- [18] Kiszewski AE, Duran-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutierrez-Castrellon P, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18(3):285–90.
- [19] Fain O, Stürnemann J, Lortholary O. Mastocytose systémique. *Rev Prat* 2005;55(15):1629–36.
- [20] Horny HP, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology* 2007;74(2):121–32.
- [21] Sperr WR, Jordan JH, Fiegl M, Escobedo L, Bellas C, Dirnhofer S, et al. Serum tryptase levels in patients with mastocytosis: correlation with mast cell burden and implication for defining the category of disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128(2):136–41.
- [22] Schwartz LB, Irani AM. Serum tryptase and the laboratory diagnosis of systemic mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14(3):641–57.
- [23] Casassus P, Caillat-Vigneron N, Martin A, Simon J, Gallais V, Beaudry P, et al. Treatment of adult systemic mastocytosis with interferon-alpha: results of a multicentre phase II trial on 20 patients. *Br J Haematol* 2002;119(4):1090–7.
- [24] Tefferi A, Li CY, Butterfield JH, Hoagland HC. Treatment of systemic mast-cell disease with cladribine. *N Engl J Med* 2001;344(4):307–9.
- [25] Akin C, Schwartz LB, Kitoh T, Obayashi H, Worobec AS, Scott LM, et al. Soluble stem cell factor receptor (CD117) and IL-2 receptor alpha chain (CD25) levels in the plasma of patients with mastocytosis: relationships to disease severity and bone marrow pathology. *Blood* 2000;96(4):1267–73.
- [26] Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res* 2001;25(7):543–51.
- [27] Valent P, Horny HP, Escobedo L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001;25(7):603–25.
- [28] Jordan JH, Walchshofer S, Jurecka W, Mosberger I, Sperr WR, Wolff K, et al. Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-x(L). *Hum Pathol* 2001;32(5):545–52.
- [29] Sperr WR, Escobedo L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny HP, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25(7):529–36.
- [30] Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Arock M, Lechner K, et al. Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol* 2003;122(5):695–717.

- [31] Escribano L, Diaz-Agustin B, Bellas C, Navalon R, Nunez R, Sperr WR, et al. Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25(7):563–70.
- [32] Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, Nunez Lopez R, Garcia-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58(1):1–8.
- [33] Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003;102(9):3093–6.
- [34] Hartmann K, Henz BM. Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *Br J Dermatol* 2001;144(4):682–95.
- [35] Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007;6(5):550–66.
- [36] Akin C, Metcalfe DD. Systemic mastocytosis. *Annu Rev Med* 2004;55:419–32.
- [37] Pardanani A, Baek JY, Li CY, Butterfield JH, Tefferi A. Systemic mast cell disease without associated hematologic disorder: a combined retrospective and prospective study. *Mayo Clin Proc* 2002;77(11):1169–75.
- [38] Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37(6):435–53.
- [39] Hauswirth AW, Simonitsch-Klupp I, Uffmann M, Koller E, Sperr WR, Lechner K, et al. Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leuk Res* 2004;28(3):249–57.
- [40] Brunsen C, Hamdy NA, Papapoulos SE. Osteoporosis and bone marrow mastocytosis: dissociation of skeletal responses and mast cell activity during long-term bisphosphonate therapy. *J Bone Miner Res* 2002;17(4):567–9.
- [41] Escribano L, Akin C, Castells M, Orfao A, Metcalfe DD. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol* 2002;81(12):677–90.
- [42] Valent P, Akin C, Sperr WR, Escribano L, Arock M, Horny HP, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res* 2003;27(7):635–41.
- [43] Musselman DL, Lawson DH, Gurnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, et al. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* 2001;344(13):961–6.
- [44] Escribano L, Diaz-Agustin B, Nunez R, Prados A, Rodriguez R, Orfao A. Abnormal expression of CD antigens in mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127(2):127–32.
- [45] Kluin-Nelemans HC, Oldhoff JM, Van Doormaal JJ, Van't Wout JW, Verhoef G, Gerrits WB, et al. Cladribine therapy for systemic mastocytosis. *Blood* 2003;102(13):4270–6.
- [46] Pardanani A, Hoffbrand AV, Butterfield JH, Tefferi A. Treatment of systemic mast cell disease with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leuk Res* 2004;28(2):127–31.
- [47] Demehri S, Corbin A, Loriaux M, Druker BJ, Deininger MW. Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia. *Exp Hematol* 2006;34(3):284–8.
- [48] Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, et al. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* 2002;99(5):1741–4.
- [49] Ronnov-Jessen D, Lovgreen Nielsen P, Horn T. Persistence of systemic mastocytosis after allogeneic bone marrow transplantation in spite of complete remission of the associated myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 1991;8(5):413–5.
- [50] Fodinger M, Mannhalter C. Molecular genetics and development of mast cells: implications for molecular medicine. *Mol Med Today* 1997;3(3):131–7.
- [51] Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004;11(1):58–64.
- [52] Garton AJ, Crew AP, Franklin M, Cooke AR, Wynne GM, Castaldo L, et al. OSI-930: a novel selective inhibitor of Kit and kinase insert domain receptor tyrosine kinases with antitumor activity in mouse xenograft models. *Cancer Res* 2006;66(2):1015–24.
- [53] Gleixner KV, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Derdak S, Sonneck K, Bohm A, et al. PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood* 2006;107(2):752–9.
- [54] Gotlib J, Berube C, Gowney JD, Chen CC, George TI, Williams C, et al. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood* 2005;106(8):2865–70.
- [55] Corbin AS, Griswold IJ, La Rosee P, Yee KW, Heinrich MC, Reimer CL, et al. Sensitivity of oncogenic KIT mutants to the kinase inhibitors MLN518 and PD180970. *Blood* 2004;104(12):3754–7.
- [56] Tanaka A, Konno M, Muto S, Kambe N, Morii E, Nakahata T, et al. A novel NF-kappaB inhibitor, IMD-0354, suppresses neoplastic proliferation of human mast cells with constitutively activated c-kit receptors. *Blood* 2005;105(6):2324–31.
- [57] Gabillot-Carre M, Lepelletier Y, Humbert M, de Sepuvela P, Hamouda NB, Zappulla JP, et al. Rapamycin inhibits growth and survival of D816V-mutated c-kit mast cells. *Blood* 2006;108(3):1065–72.
- [58] Carter MC, Robyn JA, Bressler PB, Walker JC, Shapiro GG, Metcalfe DD. Omalizumab for the treatment of unprovoked anaphylaxis in patients with systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(6):1550–1.
- [59] Tefferi A, Verstovsek S, Pardanani A. How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica* 2008;93(1):6–9.
- [60] Damaj G, Bernit E, Ghez D, Claisse JF, Schleinitz N, Harlé JR, et al. Thalidomide in advanced mastocytosis. *Br J Haematol* 2008. Feb 23; [Epub ahead of print].

Gastrointestinal Involvement and Manifestations in Systemic Mastocytosis

Harry Sokol, MD, PhD,* Sophie Georgin-Lavialle, MD,[†] Catherine Grandpeix-Guyodo, MD,[†] Danielle Canioni, MD,[‡] Stéphane Barete, MD,[†] Patrice Dubreuil, PhD,[§] Olivier Lortholary, MD, PhD,[¶] Laurent Beaugerie, MD, PhD,* and Olivier Hermine, MD, PhD[†]

Abstract: Mastocytosis is a rare and heterogeneous disease characterized by various biological and clinical features with different prognosis and treatments. The disease is usually divided into 2 categories: a pure cutaneous and a systemic disease. Clinical features can be related to mast cells' mediators release or to pathological mast cells infiltration. The diagnosis of mastocytosis is based on clinical, biological, histological, and molecular international criteria. Among all manifestations of the disease, gastrointestinal (GI) symptoms are common and can significantly impair the quality of life. The aim of this article is to review the data regarding GI involvement in mastocytosis. Articles dealing with clinical, pathophysiological, and therapeutic aspects of mastocytosis GI tract involvement were searched for using PubMed. GI manifestations in mastocytosis are reviewed. Pathogenesis of GI symptoms in systemic mastocytosis and their treatment are critically discussed. The most frequent GI symptoms are abdominal pain, diarrhea, nausea, and vomiting. GI lesions may involve all the digestive tract, from the esophagus to the rectum. The histological diagnosis of GI involvement is difficult. The treatment of GI symptoms aims to prevent and limit mast cells degranulation and/or its consequences and more rarely to control tumoral mast cells infiltration. The high prevalence of GI symptoms in masto-

cytosis and their important functional impact deserves better characterization and treatment in order to improve patients' quality of life. Diagnosis of mastocytosis GI manifestations should be evoked in the case of unexplained severe GI disorders.

(*Inflamm Bowel Dis* 2010;000:000–000)

Key Words: systemic mastocytosis, digestive tract, tryptase, c-Kit, histamine

Mastocytosis is a rare heterogeneous disorder characterized by the accumulation of abnormal mast cells in various tissues. Localized cutaneous mastocytosis is the classical presentation. In pediatric cases, disease manifestations resolve spontaneously at puberty. In contrast, systemic mastocytosis (SM) is more frequent in adults and is characterized by mast cells extracutaneous organ infiltration including bone marrow, liver, spleen, and gastrointestinal (GI) tract, and the disease has no tendency to regress. Both adult and children diseases are virtually clonal diseases in all cases,¹ and might be considered myeloproliferative disorders, the mast cells precursors originating from bone marrow. Activating *C-KIT* mutations are found in 80% of sporadic forms of mastocytosis. The most common mutation is the D816V of the phosphotransferase domain. These mutations are responsible for c-Kit receptor autophosphorylation which induces differentiation, migration, accumulation of mast cells, and activation in tissues.^{2,3} Therefore, this receptor is now considered a therapeutic target using tyrosine kinase inhibitors.

Clinical manifestations are related to mast cells' mediators release and organ infiltration. Mast cell degranulation arises spontaneously or after various stimuli. Mast cell mediators can induce the following symptoms: flushes, anaphylactoid reactions, generalized pruritus; osteoporosis; respiratory events (dyspnea, bronchospasm, mucosal hypersecretion), digestive manifestations; neuropsychiatric disorders (depression, asthenia, anxiety, memory disorders, sleeping disorders)⁴; and interstitial cystitis (pollakiuria). Most of the symptoms, although not life threatening, may induce a significant impairment of quality of life.⁴ Events related to pathological mast cell infiltration include cutaneous

Received for publication December 2, 2009; Accepted December 2, 2009.

From the *Department of Gastroenterology and Nutrition; Saint-Antoine Hospital, Université Paris VI, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, [†]Department of Adult Hematology, National Reference Center for Mastocytosis and CNRS UMR 8147, Necker Hospital, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, [‡]Department of Pathology and National Reference Center for Mastocytosis; Necker Hospital, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, [§]INSERM UMR 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli Calmette, Marseille, France, [¶]Department of Tropical and Infectious Diseases and National Reference Center for Mastocytosis, Necker Hospital, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

Reprints: Dr. Harry Sokol, Université Paris VI, Department of Gastroenterology and Nutrition, Saint-Antoine Hospital, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571, Paris Cedex 12, France

(e-mail: sokol_harry@yahoo.fr or ohermine@gmail.com)

Copyright © 2010 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.21218

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE 1. International Criteria to Diagnose Mastocytosis (from Valent et al (7))

Cutaneous mastocytosis	Typical skin lesions: typical clinical signs AND positive histology
Systemic mast cell disease	*SM criteria*:
Major	Multifocal dense mast cell infiltrates detected in bone marrow sections and/or other extracutaneous organ(s) by tryptase immunohistochemistry or other stain (c-kit)
Minor	<p>a. In mast cell infiltrates detected in sections of bone marrow or other cutaneous organs, >25% of mast cells are spindle-shaped or: in bone marrow spears, atypical mast cells comprise >25% of all MC.</p> <p>b. Detection of <i>c-kit</i> point mutation at codon 816 in bone marrow or blood or extracutaneous organ(s)</p> <p>c. Kit+ mast cells in bone marrow or blood or extracutaneous organ(s) coexpress CD2 or/and CD25</p> <p>d. Serum total tryptase concentration</p> <p>e. persistently >20 ng/mL (invalid in case of an AHNMD)</p> <p>If 1 major and 1 minor OR 3 minor criteria are fulfilled, then the diagnosis is SM</p>

symptoms (commonly, urticaria pigmentosa), bone marrow infiltration (90% of SM), hepatosplenomegaly, osteosclerosis, digestive manifestations (GI and hepatobiliary), and infrequently cardiopulmonary features. When this infiltration results in organ function impairment, the disease is considered aggressive and may decrease life expectancy.^{5,6}

Mastocytosis diagnosis is established on international criteria (Table 1) based on the presence of abnormal mast cell infiltrates in a tissue section (most frequently skin biopsy). To assess whether the disease is systemic, extracutaneous organ sections have to be involved by pathological mast cells infiltration. To be diagnosed, the disease needs to fulfill WHO diagnostic criteria (Table 1) associating 1 major and 1 minor criteria or 3 minor criteria.⁷ The major criterion is based on histological or immunohistochemistry findings. Presence of dense focal mast cells infiltrate consisting of at least 15 mast cells and detectable in more than 1 site in the tissue(s) (multifocal pattern) is the major criterion. Minor criteria include typical cytomorphological aspects of mast cells (in tissue(s) sections and/or bone marrow smear) as well as to molecular markers showing abnormal features of mast cells, including the presence of the *C-KIT* D816V mutation, coexpression of c-Kit (CD117) with CD2 and/or CD25, elevated serum total tryptase concentration >20 ng/mL (this criterion is not valid if a hematological nonmast cell lineage disease coexists).

When the patient is diagnosed, mastocytosis can then be classified according to the WHO as cutaneous mastocytosis or SM. SM is further divided into the following categories: indolent SM, SM with an associated clonal hematologic nonmast cell lineage disease (AHNMD), aggressive SM, mast cell leukemia, mast cell sarcoma, and extracutaneous mastocytoma.

Both indolent SM and pure cutaneous forms do not decrease patients' life expectancy⁵ but may lead to significant disabilities,⁴ whereas aggressive forms may shorten life.^{5,6}

GI manifestations are very frequent and they represent a major complaint of the disease. Clinical, pathophysiological, and therapeutic aspects of GI mastocytosis involvement, therefore excluding liver and biliary involvement, are discussed in this review.

GI SYMPTOMS AND MASTOCYTOSIS

Frequency

The reported incidence of GI symptoms in SM varies according to studies. The first major studies^{8,9} reported 20% of GI symptoms whereas most of later studies until 1985 reported a 40%–50% rate.^{10,11} Studies carried out since 1985 report a higher frequency from 60%–80%, making GI symptoms as frequent as pruritus among patients with SM.^{12–14} Several factors can contribute to this great variability in published series: the diversity of SM definition, the lack of consensus about GI symptoms definition and detection threshold, and differences in data collection (retrospective vs. prospective). Several studies point out the chronicity of GI symptoms in SM and their role in altered quality of life.^{15,16}

Main Features (Table 2)

Abdominal pain is the most common symptom, affecting approximately half of all patients.^{8,12,14–18} Diarrhea represents about 40% of GI symptoms; nausea and vomiting occur in 30% of the cases.^{8,12–15,18,19} The few studies that collected data on GI bleeding report a frequency of 10%.^{8,13,14,19} Regarding peptic ulcer disease, data from older studies must be carefully analyzed because in most cases they did not include an endoscopic examination. In recent studies, peptic ulcer disease was reported in about 25%.^{2,12–14}

TABLE 2. Gastrointestinal Features of Patients with Mastocytosis

Study	Webb	Granerus	Parwaresch	Chemer	Travis	Horan	Lim	Sokol
Year	1982 (57)	1983 (10)	1985 (11)	1988 (12)	1988 (2)	1991 (13)	2009 (5)	2009*
Number of Patients	<i>n</i> = 26	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 125	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 58	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 342	<i>n</i> = 176
Abdominal pain	40%	36%	12%	80%	35%	81%	NA	72%
Diarrhea	40%	14%	20%	63%	24%	67%	NA	32%
Nausea/vomiting	28%	NA	19%	NA	21%	57%	NA	31%
Ulcer disease	24%	14%	10%	44%	36%	24%	NA	10%
Abdominal discomfort	NA	NA	NA	NA	NA	NA	65%	80.7%

*In preparation; NA, not available.

GI LESIONS ACCORDING TOPOGRAPHY

Esophageal Disorders

Esophageal lesions are rarely mentioned in the course of SM. However, symptoms related to gastroesophageal reflux (pyrosis) may occur and lesions can be found, including esophagitis and peptic esophageal stenosis.^{2,13,14,20} Rare esophageal motor disorders have also been reported and appear to be frequent in the course of SM, especially lower esophageal sphincter dysfunction (rest pressure decrease, swallowing relaxation absence).^{21,22}

Gastric Disorders: Ulcer Disease

In most studies, patients with SM have an increased histamine production.^{10,12,23,24} Histamine is a well-known gastric acid secretion stimulus. In reported cases, the basal acid secretion was variable: elevated, normal, or decreased.¹⁴ In the only prospective study evaluating this parameter in SM,¹² the basal acid secretion was increased among 6 out of 16 studied patients (38%). Five of these 6 patients also had an abnormal esogastroduodenal endoscopy. In this same study, 1 patient had a complete achlorhydria, as previously described.¹⁴ Interestingly, in the study by Chemer et al,¹² while all patients had an increased level of histamine in the serum, more than 50% displayed a normal basal acid secretion. The possible explanations for the dissociation between histamine serum levels and gastric acid secretion are 1) that measured histamine is not biologically active; 2) that hyper-histaminemia is not sufficient to stimulate gastric parietal cells; 3) that H₂ histamine receptors on parietal gastric cells are desensitized (and therefore their activation would require very high levels of histamine); 4) or even that the circulating histamine rate is not the major gastric acid secretion determinant (gastric mucosal histamine concentration would be more important in this case). An increased gastric mucosal histamine concentration was observed among some patients with SM,^{23,25} but its exact role in the gastric acid hyperse-

cretion remains unclear. The maximal acid secretion has been poorly studied among patients with SM. In the study by Chemer et al¹² it was measured in 16 patients and was only increased in 12% of cases, even though all patients displayed elevated histamine level in sera.

Stomach: Other Lesions

Urticarian gastric lesions have been observed in several patients.^{20,23,26–28} Gastritis lesions with mucosal and submucosal inflammatory infiltrates associated with mast cell infiltrates were observed in several SM patients.^{16,28–30}

Small Intestine

Intestinal absorption could be disturbed in SM patients.^{2,17,31} A prospective study on 16 patients showed malabsorption in 5 (31%)¹²; however, steatorrhea is mild or moderate in most cases.¹⁴ Histological lesions of the small intestine are observed in many patients, but the prevalence of these lesions is unknown because of the lack of consecutive patient series studies. In many studies, intestinal villus are blunt and can even sometimes be partially atrophic.^{31–36} A few cases of total villus atrophy are reported.^{37,38} Furthermore, an inflammatory infiltrate in the lamina propria has been observed in many cases. This infiltrate consists essentially of plasma cells and eosinophils,^{32,35,37,38} and in some cases of a large number of mast cells expressing CD2 and/or CD25.^{25,34,36,38–40}

Considering the results of radiological studies in the course of SM, macroscopic intestinal lesions seem to be frequent. In a study including esogastroduodenal and small bowel follow-through in 78 patients with SM,⁴¹ the most frequently observed lesion (73% of patients) was 1–3-mm nodules in bowel mucosa, probably related to edema. In a second study regarding 14 patients,¹³ 57% displayed thickening of intestinal mucosa, nodular, or polypoid lesions.

Colon and Rectum

Except diarrhea, no other symptom related to colonic lesion was reported in the course of SM. In addition, the involvement of colonic damage in the pathogenesis of diarrhea in SM is not clear. The observed colonic lesions include small nodules of the mucosa,⁴¹ mucosal edema, and urticarian lesions,^{34,42} and polypoid lesions.^{15,43,44} Histologically, these lesions often consist of an inflammatory infiltrate with polycyclic eosinophils and mast cells, or mast cells alone.^{14,16,28,30,38} In some cases colonic ulcerations have been reported, leading to a wrong Crohn's disease diagnosis.⁴³ However, the correlation between the presence of colonic injuries and diarrhea in SM has not been assessed.

PATHOGENESIS OF GI SYMPTOMS IN SM

Pathogenesis of GI symptoms occurring in the course of SM is unclear. Rarity and polymorphism of the presentation raise difficulties to perform prospective studies on a large number of patients.

Abdominal Pain

Abdominal pain has been attributed to ulcer disease, GI mast cell infiltration, or mast cell mediators' release.¹⁴ Abdominal pain may be dyspeptic or not but both may coexist in the same patient.^{12,13} In the prospective study by Cherner et al,¹² patients with abdominal pain were relieved by H2 histamine receptor antagonists in 56% of cases, suggesting an important role of gastric acid hypersecretion in pain pathogenesis. This gastric hypersecretion was most likely related to hyperhistaminemia as a correlation between histamine level in sera and acid secretion was found. Currently, there is no argument for hypergastrinemia to explain acid secretion in SM.¹⁴

Diarrhea

The pathogenesis of diarrhea in patients with SM is not well understood and possibly related to different mechanisms from one patient to another. For some patients, gastric hypersecretion is a major factor contributing to diarrhea.^{12,45} In these patients the mechanism by which the gastric hypersecretion causes diarrhea is probably similar to Zollinger-Ellison syndrome where hyperacidity inactivates pancreatic enzymes and directly affects intestinal villous. In other patients an overproduction of prostaglandin D2 (PGD2) could be an important factor in the diarrhea pathogenesis.⁴⁵⁻⁴⁷ The PGD2 production can temporally be increased in some SM patients.^{14,45-47} In these cases treatment with aspirin inhibiting prostaglandin synthesis can be highly efficient in diarrhea.⁴⁶ Nevertheless, aspirin could also induce mast cell degranulation; thus, in this indication aspirin will preferentially be started at low doses and asso-

ciated with H1 and H2 receptor antagonists⁴⁷ as well as a proton pump inhibitor treatment. The exact frequency of the PGD2 overproduction involvement in SM-associated diarrhea remains unknown.

Small bowel or colon mast cell infiltration could also play a role in some patients. However, respective roles of mast cell infiltration itself, mast cell secretions, and induced architectural alterations (such as partial villous atrophy or urticarian lesions) are not clear. No correlation between diarrhea and small bowel or colon histological lesions has been established to date. Finally, the role of an accelerated transit induced by mast cells mediator release has been mentioned¹⁴ but still remains to be confirmed.¹²

Malabsorption

Malabsorption is uncommon in SM and occurs in aggressive forms.³⁷ In these patients, pancreatic function is normal and malabsorption is related to small bowel damages, with abnormal functional tests and histological abnormalities, such as blunt villous, inflammatory infiltrates with or without mast cell excess.¹⁴ Gastric acid hypersecretion plays possibly a role in some cases; this hypothesis is strengthened by the normalization of intestinal absorption observed after correcting gastric hyperacidity in some patients.⁴⁸ In other cases, malabsorption is not clearly linked to gastric hyperacidity; pH may be normal^{23,37,47,49} or malabsorption may persist despite acid secretion normalization.^{12,33,46,50} Interestingly, rare cases of gluten-sensitive enteropathy have been reported in SM.³⁶⁻³⁸

DIAGNOSIS OF GI MANIFESTATIONS IN THE COURSE OF SM

Patients with Previously Diagnosed SM

In a patient with confirmed SM, GI symptoms are very frequent (Table 2). These symptoms should be explored by GI tract endoscopy with multiple biopsies in order to look for mast cell infiltration. After a screen by coloration with Toluidine blue and Giemsa, mast cells should be detected using immunohistochemistry methods because these cells are not easily detectable with standard staining. Mast cells express c-Kit (CD117) and tryptase, and can coexpress CD25 and/or CD2 in SM. The lack of mast cell GI infiltration does not rule out the mastocytosis origin of symptoms, as mediators released by distant mast cells can induce GI symptoms.

Patients Without Previous SM Diagnosis

GI symptoms occurring in the course of SM are not specific; they can impair quality of life without objective signs of GI dysfunction. Without other systemic signs and particularly cutaneous (cutaneous features are absent in nearly 40% of patients in some SM series¹⁴), such

TABLE 3. Gradation of Symptoms in Patients with Mastocytosis (from Valent et al (6))

Grade	Symptoms	Definition
0	No symptoms	Prophylaxis but require no other therapy
1	Mild, infrequent	Prophylaxis \pm treatment
2	Mild/Moderate, frequent	Requires and can be controlled by daily therapy
3	Severe, frequent	Suboptimal or unsatisfactory control with daily and combination therapy
4	Severe adverse events*	Requires immediate therapy and emergency hospitalization

Avoid triggering factors; use of histamine receptor antagonists (H1 and H2) in prevention.

*Frequency to clarify: A: 1/year; B: between 1/month and 1/year; C >1/month.

symptoms match the diagnosis of irritable bowel syndrome (IBS).⁵¹ Patients with disabling IBS symptoms often undergo biological, radiological, and endoscopic explorations. Even though no official guidelines exist, it could be interesting to measure tryptase level in sera at the same time as the usual biological tests and encourage pathologists to look for mast cells on GI biopsies (ckit/CD117 and/or tryptase antibody). Tryptase level in sera can be normal even in patients with true SM. Based on the results of these simple tests, more explorations could be discussed, such as performing a bone marrow smear or biopsy that may also allow detection of *C-KIT* mutation by molecular biology.

Malignant GI diseases can be mistaken for SM. Mutually, SM could simulate atypical form of Zollinger–Ellison syndrome, carcinoid syndrome, or VIPoma. These 3 diseases can induce abdominal pain, diarrhea, malabsorption, ulcers for Zollinger–Ellison, and flushes for carcinoid and VIPoma. Some clinical features can help to distinguish these 3 diseases from SM: SM flushes are not associated with sweating; pigmentosa urticaria is common in the course of SM, while a rash is infrequently observed in the other 3 diseases; VIPoma diarrhea is much more abundant than in SM (often greater than 2 L / 24 hours against less than 1 L / 24 hours); hepatosplenomegaly is observed in almost 20% of SM, whereas it is virtually absent in the 3 other diseases. Furthermore, simple biological dosages can confirm or invalidate the diagnosis: gastrinemia, VIP level in sera and serotoninemia levels, as well as urinary 5HIAA, which are respectively elevated in Zollinger–Ellison syndrome, VIPoma, and carcinoid syndrome, whereas these markers are normal in SM.

TREATMENT OF GI SYMPTOMATOLOGY IN THE COURSE OF SM

SM requires therapeutic adaptation to each patient profile. Given its low prevalence, the treatment is essentially based on experience and not on prospective randomized trials and has 2 main objectives.^{52,53} The first aim is to prevent and limit mast cell degranulation and/or its con-

sequences: until recently, it was the only existing treatment. The second aim is to control pathological mast cell tissue infiltration: promising results are observed with alpha interferon and cladribine. Progress in understanding the pathophysiology of mastocytosis opened new therapeutic approaches, including targeted therapies against tyrosine kinase activity of c-Kit. Few molecules are actually in development. According to the latest European consensus conference, severity and frequency of symptoms should be graded (Table 3) in order to adapt the treatment (Table 4).³ General measures and symptomatic treatment remain classical, using histamine receptor antagonists, cromolyn sodium, and, more rarely, aspirin and leukotriene antagonists.³ For important abdominal pain crisis, budesonide, which has a low systemic effect and thus limited adverse effects, can be used with a maximal dose of 9 mg/day.

TABLE 4. Stepwise Application of Mediator-targeting Drugs in Gastrointestinal Manifestations of Mastocytosis (Adapted from Valent et al. (6))

Clinical Symptom and Mediator Effect	Step ^a	Drug to be Considered
Peptic ulcer disease + bleeding	1	H2 histamine receptor antagonists
	2	Proton pump inhibitors and H2 blockers
	3	Fibrinogen, coagulation factors, protamin or platelets on demand ^b
Diarrhea, abdominal pain, abdominal cramping, nausea, vomiting	1	H1 and H2 histamine receptor antagonists
	2	Oral Cromolyn sodium
	3	Leukotriene antagonist
	4	Short-term glucocorticotherapy

^aIn all cases: avoid triggering factors. In aggressive disease with organ dysfunction related to mast cell infiltration, indication of a cytoreductive therapy (Cladribine, anti-tyrosine kinase)

^bSpecific treatment associated if GI bleeding.

General corticotherapy can help to control a diarrhea with malabsorption^{3,54} or abdominal painful crisis associated with edematous flares. The initial dose is 1 mg/kg/day, with a fast decrease because chronic consumption could worsen osteoporosis, which is frequent in SM (Barete et al, 2009, submitted).^{2,55,56} Cyto-reductive therapy is indicated for aggressive disease with organ dysfunction linked to mast cell infiltration. Interferon can significantly decrease GI symptoms⁴³ but is often poorly tolerated, especially because of psychiatric adverse events. Cladribine is a nucleosidic analog; it leads to GI symptom improvement in more than 60% cases.⁵⁸ However, responses are usually temporary and successive treatments are necessary, raising concerns of myelotoxic risks and immunosuppressive effects. Specific tyrosine kinase inhibitors constitute a major hope in SM treatment. They are currently being tested in therapeutic trials in order to improve SM symptoms as well as mast cell infiltration.

CONCLUSION

SM is a disease with a heterogeneous presentation with respect to clinical and biological features, as well as prognosis. This heterogeneity must be taken into account to define the best therapeutic strategy. The high prevalence of GI symptoms and their important functional impact deserves better characterization and treatment in order to improve patients' quality of life. Diagnosis of SM-associated GI manifestations should be evoked in case of unexplained severe intestinal disorders. Simple tests, such as measurement of tryptase levels in sera and mast cell immunohistochemistry of GI tract biopsies, associated with the biological and morphological explorations usually done in this situation, could help to improve diagnoses.

REFERENCES

1. Bodemer C, Hemine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D(816)V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*. 2009 [Epub ahead of print].
2. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, et al. Systemic mast cell disease. Analysis of 58 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 1988;67:345-368.
3. Valent P, Akin C, Escribano L, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:435-453.
4. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, et al. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS One*. 2008;3:e2266.
5. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113:5727-5736.
6. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114:3769-3772.
7. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25:603-625.
8. Demis DJ. The mastocytosis syndrome: clinical and biological studies. *Ann Intern Med*. 1963;59:194-206.
9. Demis DJ, Walton MD, Higdon RS. Histaminuria in urticaria pigmentosa. A clinical study and review of recent literature with definition of the mastocytosis syndrome. *Arch Dermatol*. 1961;83:127-138.
10. Granerus G, Olafsson JH, Roupe G. Studies on histamine-metabolism in mastocytosis. *J Invest Dermatol*. 1983;80:410-416.
11. Parwaresch MR, Horny HP, Lennert K. Tissue mast cells in health and disease. *Pathol Res Pract*. 1985;179:439-461.
12. Cherner JA, Jensen RT, Dubois A, et al. Gastrointestinal dysfunction in systemic mastocytosis — a prospective study. *Gastroenterology*. 1988;95:657-667.
13. Horan RF, Austen KF. Systemic mastocytosis — retrospective review of decades of clinical experience at the Brigham and Women's Hospital. *J Invest Dermatol*. 1991;96:S5-S14.
14. Jensen RT. Gastrointestinal abnormalities and involvement in systemic mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14:579-623.
15. Kirsch R, Geboes K, Shepherd NA, et al. Systemic mastocytosis involving the gastrointestinal tract: clinicopathologic and molecular study of five cases. *Mod Pathol*. 2008;21:1508-1516.
16. Tebbe B, Stavropoulos PG, Krasagakis K, et al. Cutaneous mastocytosis in adults — evaluation of 14 patients with respect to systemic disease manifestations. *Dermatology*. 1998;197:101-108.
17. Horan RF, Sheffer AL, Austen KF. Cromolyn sodium in the management of systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:852-855.
18. Mutter RD, Tannenbaum M, Ullmann JE. Systemic mast cell disease. *Ann Intern Med*. 1963;59:887-906.
19. Brunning RD, McKenna RW, Rosai J, et al. Systemic mastocytosis — extracutaneous manifestations. *Am J Surg Pathol*. 1983;7:425-438.
20. Huang TY, Yam LT, Li CY. Radiological features of systemic mast-cell disease. *Br J Radiol*. 1987;60:765-770.
21. Lorcerie B, Arveux I, Chaffert B, et al. Aspirin and systemic mastocytosis. *Lancet*. 1989;2:1155-1155.
22. Wienbeck M, Rohner HG, Rodemund OE, et al. [Esophageal function in mastocytosis.] *Verh Dtsch Ges Inn Med*. 1978;977-979.
23. Ammann RW, Vetter D, Deyhle P, et al. Gastrointestinal involvement in systemic mastocytosis. *Gut*. 1976;17:107-112.
24. Friedman BS, Steinberg SC, Meggs WJ, et al. Analysis of plasma histamine levels in patients with mast-cell disorders. *Am J Med*. 1989;87:649-654.
25. Jamun S, Zachariae H. Mastocytosis (urticaria pigmentosa) of skin, stomach, and gut with malabsorption. *Gut*. 1967;8:64-68.
26. Borda F, Uribearena R, Riveropuente A. Gastroscopic findings in systemic mastocytosis. *Endoscopy*. 1983;15:342-343.
27. Clemett AR, Fishbone G, Levine RJ, et al. Gastrointestinal lesions in mastocytosis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1968;103:405-412.
28. Scolapio JS, Wolfe J, Malavet P, et al. Endoscopic findings in systemic mastocytosis. *Gastrointest Endosc*. 1996;44:608-610.
29. Friedman BS, Metcalfe DD. Effects of tixocortol pivalate on gastrointestinal disease in systemic mastocytosis — a preliminary study. *Clin Exp Allergy*. 1991;21:183-188.
30. Miner PB, Jr. The role of the mast cell in clinical gastrointestinal disease with special reference to systemic mastocytosis. *J Invest Dermatol*. 1991;96:40S-43S; discussion 43S-44S.
31. Barriere H, Dreno B, Pecquet C, et al. [Systemic mastocytosis and intestinal malabsorption.] *Sem Hop*. 1983;59:2925-2931.
32. Braverman DZ, Dollberg L, Shiner M. Clinical, histological, and electron-microscopic study of mast-cell disease of the small bowel. *Am J Gastroenterol*. 1985;80:30-37.
33. Bredfeldt JE, O'Laughlin JC, Durham JB, et al. Malabsorption and gastric hyperacidity in systemic mastocytosis — results of cimetidine therapy. *Am J Gastroenterol*. 1980;74:133-137.
34. Dantzig PI. Tetany, malabsorption, and mastocytosis. *Arch Int Med*. 1975;135:1514-1518.
35. Fishman RS, Fleming CR, Li CY. Systemic mastocytosis — with review of gastrointestinal manifestations. *Mayo Clin Proc*. 1979;54:51-54.
36. Scott BB, Hardy GJ, Losowsky MS. Involvement of small-intestine in systemic mast-cell disease. *Gut*. 1975;16:918-924.

37. Bank S, Marks IN. Malabsorption in systemic mast cell disease. *Gastroenterology*. 1963;45:535-549.
38. Broitman SA, McCray RS, May JC, et al. Mastocytosis and intestinal malabsorption. *Am J Med*. 1970;48:382-389.
39. Belcon MC, Collins SM, Castelli MF, et al. Gastrointestinal hemorrhage in mastocytosis. *Can Med Assoc J*. 1980;122:311-314.
40. Reisberg IR, Oyakawa S. Mastocytosis with malabsorption, myelofibrosis, and massive ascites. *Am J Gastroenterol*. 1987;82:54-60.
41. Johnson AC, Johnson S, Lester PD, et al. Systemic mastocytosis and mastocytosis-like syndrome — radiologic features of gastrointestinal manifestations. *South Med J*. 1988;81:729-733.
42. Berlin C. Urticaria pigmentosa as a systemic disease. *AMA Arch Dermatol*. 1955;71:703-712.
43. Mickys U, Barakauskiene A, De Wolf-Peeters C, et al. Aggressive systemic mastocytosis complicated by protein-losing enteropathy. *Digest Liver Dis*. 2007;39:693-697.
44. Takasaki Y, Tsukasaki K, Jubashi T, et al. Systemic mastocytosis with extensive polypoid lesions in the intestines; successful treatment with interferon-alpha. *Intern Med*. 1998;37:484-488.
45. Awad JA, Morrow JD, Roberts LJ 2nd. Detection of the major urinary metabolite of prostaglandin D2 in the circulation: demonstration of elevated levels in patients with disorders of systemic mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93:817-824.
46. Poynard T, Nataf C, Messing B, et al. Secretory diarrhea and prostaglandin D2 overproduction in systemic mastocytosis. *N Engl J Med*. 1982;307:186.
47. Roberts LJ 2nd, Sweetman BJ, Lewis RA, et al. Increased production of prostaglandin D2 in patients with systemic mastocytosis. *N Engl J Med*. 1980;303:1400-1404.
48. Hirschowitz BI, Groarke JF. Effect of cimetidine on gastric hypersecretion and diarrhea in systemic mastocytosis. *Ann Intern Med*. 1979;90:769-771.
49. Achord JL, Langford H. The effect of cimetidine and propantheline on the symptoms of a patient with systemic mastocytosis. *Am J Med*. 1980;69:610-614.
50. Feldman EJ, Isenberg JL. Effects of metiamide on gastric-acid hypersecretion, steatorrhea and bone-marrow function in a patient with systemic mastocytosis. *N Engl J Med*. 1976;295:1178-1179.
51. Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006;130:1377-1390.
52. Georgin-Lavialle S, Barete S, Suarez F, et al. [Current concepts and treatment advances in systemic mastocytosis.] *Rev Med Interne*. 2009;30:25-34.
53. Marrache F, Memain N, Bonte I, et al. [Treatment of systemic mastocytosis.] *Rev Med Interne*. 2003;24:594-601.
54. Escribano L, Akin C, Castells M, et al. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol*. 2002;81:677-690.
55. Johansson C, Roupe G, Lindstedt G, et al. Bone density, bone markers and bone radiological features in mastocytosis. *Age Ageing*. 1996;25:1-7.
56. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res*. 2003;27:635-641.
57. Webb TA, Li CY, Yam LT. Systemic mast cell disease: a clinical and hematopathologic study of 26 cases. *Cancer*. 1982;49:927-938.
58. Lortholary L, Vargaftig J, Feger F, et al. Efficacy and safety of cladribine in adult systemic mastocytosis: a french multicenter study of 33 patients. *Blood*. 2004;104:A661.



Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Review

The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases

Sophie Georgin-Lavialle^{a,b}, Achille Aouba^a, Luc Mouthon^c, J. Arturo Londono-Vallejo^d, Yves Lepelletier^b, Anne-Sophie Gabet^b, Olivier Hermine^{a,b,*}^a Department of Adult Haematology, Necker Enfants-Malades Hospital, Mastocytosis Reference Center, Paris Descartes University, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 149 rue de Sévres, 75015 Paris, France^b UMR CNRS 8147, Necker Enfants-Malades Hospital, Mastocytosis Reference Center, Paris Descartes University, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 149 rue de Sévres, 75015 Paris, France^c Department of Internal Medicine, French National Reference Center for Systemic Vasculitides, French Vasculitis Study Group Hôpital Cochin, Université de Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 27–29, rue du Faubourg St-Jacques, 75679 Paris Cedex 14, France^d Laboratoire Télomères et Cancer, UMR3244-Pavillon Trouillet-Rossignol, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2010

Accepted 22 April 2010

Available online 6 May 2010

Keywords:

Telomere length

Telomerase activity

Inflammatory disease

Autoimmune disease

Systemic disease

ABSTRACT

Telomeres are specialized nucleoprotein structures that cap and protect the ends of chromosomes. They can be elongated by the telomerase enzyme, but in telomerase negative cells, telomeres shorten after each cellular division because of the end replicating problem. This phenomenon leads ultimately to cellular senescence, conferring to the telomeres a role of biological clock. Oxidative stress, inflammation and increased cell renewal are supplementary environmental factors that accelerate age-related telomere shortening. Similar to other types of DNA damage, very short/dysfunctional telomeres activate a DNA response pathway leading to different outcomes: DNA repair, cell senescence or apoptosis. During the last 10 years, studies on the telomere/telomerase system in autoimmune and/or systemic immune-mediated diseases have revealed its involvement in relevant physiopathological processes. Here, we present a literature review of telomere and telomerase homeostasis in systemic inflammatory diseases including systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and granulomatous diseases. The available data indicate that both telomerase activity and telomere length are modified in various systemic immune-mediated diseases and appear to be connected with premature immunosenescence. Studies on the telomere/telomerase system open new research avenues for the basic understanding and for therapeutic approaches of these pathologies.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. The telomeres and telomerase system	647
2. Telomere length and telomerase activity in autoimmune diseases	647
2.1. Systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases.	647
2.2. Rheumatoid arthritis	647
2.3. Granulomatous diseases: Wegener's granulomatosis and sarcoidosis	647
2.4. Systemic sclerosis	647
2.5. Juvenile idiopathic arthritis and adult-onset Still disease	649
2.6. Myositis, psoriasis and atopic dermatitis.	649
2.7. Primary biliary cirrhosis	649
2.8. Idiopathic pulmonary fibrosis.	649
2.9. Autoimmune diabetes	649
3. Possible reasons of telomeric erosion	649
4. Consequences of telomeric erosion	649

* Corresponding author. Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sévres, 75015 Paris, France. Tel.: +33 44 49 52 83.
E-mail address: ohermine@gmail.com (O. Hermine).

5. Conclusion	650
Take-home messages	650
Conflict of interest	650
Acknowledgements	650
References	650

1. The telomeres and telomerase system

Human chromosomes are capped by telomeres, which consist of tandem repeats of the DNA sequence TTAGGG and their associated proteins. Telomeres protect chromosomes from DNA degradation and end-fusions which could lead to chromosomal breaks and recombination [1]. Telomerase is a reverse transcriptase enzyme, which adds telomeric repeats to the ends of chromosomes, thus compensating the telomeric loss [2] that occurs after each cellular division due to the inability of conventional DNA polymerases to fully replicate the ends of a linear DNA molecule [1,2]. In telomerase negative cells, telomeres shorten after each cellular division until they reach a critical size leading to Mortality 1 check-point (M1) activation resulting in cell senescence. Telomere length thus determines the replication capacity of a cell. According to this telomeric "clock model", telomeres are essential regulators of cell (and, likely, organismal) lifespan [3]. The M1 point is under the control of p53 and/or Rb genes. In case of p53 and/or pRb inactivation, cells continue to divide with persistent telomere erosion and destabilization resulting in DNA breaks, recombination and/or chromosomal ends fusion. Such telomere instability correspond to Mortality 2 check-point (M2) and leads in most of the cases, to apoptosis. However, rare cultured cells can circumvent M2 and become immortalized by reactivating either telomerase enzyme or a recombination-based mechanism to maintain telomere length called ALT (Alternate Lengthening of Telomeres) [3,4].

2. Telomere length and telomerase activity in autoimmune diseases

Many autoimmune and inflammatory diseases are characterized by spontaneous hyperactivity of the immune system including autoantibody production. Although their pathophysiological mechanisms are not completely elucidated, in most of these diseases, inflammation and oxidative stress are parts of the process. Interestingly, inflammation, oxidative stress as well as increased leucocyte renewal are major environmental factors associated with telomeres shortening acceleration [5], suggesting a connection between the telomere/telomerase system and autoimmune and/or inflammatory diseases. In the last decade, this observation, together with data emerging from intensive researches in oncology on the telomere/telomerase system and its potential therapeutic implications, spurred studies assessing the role of this system in the physiopathology of autoimmune and/or inflammatory diseases. We propose a summary of all published articles on this topic (Table 1):

2.1. Systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases

In systemic lupus erythematosus (SLE), a total of 273 patients were studied [6–14]. Telomere length and telomerase activity were measured, in peripheral mononuclear blood cells (PBMC), but also in monocytes, granulocytes [14] and lymphocyte subpopulations (B and T lymphocytes as well as CD4⁺ and CD8⁺ T cells and their respective naive and memory subpopulations). Telomere length of PBMC was decreased in SLE, especially in young patients. The telomerase activity was higher in patients than in controls and appeared to correlate to the Disease Activity Index (SLE Disease Activity Index: SLEDAI), especially in B lymphocytes. Immunosuppressive agents seem to induce a telomerase activity decrease, but

these results were obtained on a limited group of patients [12]. One group reported 11 patients followed for mixed connective tissue disease who also presented increased telomerase activity [9]. In Sjögren's syndrome telomerase activity in PBMC from 25 patients has been measured and was reported to be increased [9,13].

2.2. Rheumatoid arthritis

In rheumatoid arthritis (RA), PBMC from more than 255 subjects were studied [13,15–18]. Naive and memory CD4⁺ T cells subpopulations were also analyzed. Telomeres length of PBMC, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes were decreased and this phenomenon was independent of the duration and the severity of the disease [17]. Telomerase activity was higher in RA patients than in controls. Telomeric erosion was strongly related to the HLA-DRB1 04, since healthy relatives of RA patients as well as healthy controls carrying this HLA allele had shorter telomeres than controls which did not carry this allele [16].

Telomere length of circulating hematopoietic precursor cells (CD34⁺) was measured among 25 RA patients [19]. Their telomeres were shortened in comparison with controls, especially among patients younger than 30 years. There was no correlation between telomere shortening and disease duration, disease activity or immunosuppressive therapy. Marked telomere erosion found in these cells could indicate proliferative stress-induced senescence. Premature telomere erosion independently of disease activity markers raised the question of whether defective telomere maintenance was an intrinsic defect in RA, rather than the consequence of inflammation and/or immunosuppressive therapy. Fujii et al. studied the telomerase activity of isolated naive CD4⁺ T cells of RA patients [20]. Upon stimulation, this lymphocyte subset was defective in up-regulating telomerase activity due to hTERT insufficient induction. Overexpression of ectopic hTERT restored proliferative expansion of these cells. Telomerase insufficiency did not affect memory T cells or CD34⁺ hematopoietic stem cells and was independent from disease activity. These recent results showed that telomerase could have an implication in RA physiopathology.

2.3. Granulomatous diseases: Wegener's granulomatosis and sarcoidosis

The telomeres length of PBMC was studied among 22 patients with Wegener's granulomatosis. Telomeric erosion was increased among patients with long-term disease ($p < 0.001$) and no telomerase activity detected [21]. The telomere length in CD28⁺ T cells was significantly decreased in patients when compared to non-immune renal nephritis patients. The results obtained on this quite small cohort of patients and showing that CD28⁺ T cells were highly senescent, led authors to suggest that a portion of T cells could have undergone replicative senescence, which in turn indicates clonal expansion of T cells as a consequence of activation [21,22]. The telomeres length of PBMC was studied among 111 patients with sarcoidosis. Telomeric erosion was found more frequently than in controls ($p < 0.001$) [23].

2.4. Systemic sclerosis

In systemic sclerosis, PBMC from a total of 114 subjects have been studied [9,13,24,25]. Three authors reported telomeric erosions in 71 patients (presenting diffuse or limited systemic sclerosis), but also

Table 1

Telomeres and telomerase in autoimmune and/or systemic diseases.

Author	Disease	Studied cells	Telomere length measure-ment	Telomerase activity analysis	Number of patients	Results
Honda [8]	SLE	PBMC	Yes	Yes	n = 58	Telomeric erosion except on memory CD8 ⁺ CD28 ⁻ T cells
Katayama [9]	SLE	PBMC	ND	Yes	n = 17	Elevated TA
Kurosaka [11]	SLE	PBMC	Yes (n = 30)	Yes (n = 55)	n = 30 n = 55	Telomeric erosion TA correlated to SLEDAI
Klapper [10]	SLE	PBMC	Yes (n = 5)	Yes (n = 9)	n = 5 n = 9	Elevated TA in CD19 ⁺ B cells TL identical
Kurosaka [12]	SLE	PBMC, T and B lymphocytes	Yes	Yes	n = 34	Elevated TA, especially in B cells and if elevated SLEDAI
Fritsch [7]	SLE	Lymphocyte sub populations	Yes	Yes	n = 7	Telomeric erosion when naïves CD4 ⁺ T cells differentiate
Tarhan [13]	SLE	PBMC	ND	Yes	n = 15	Elevated TA
Beier [6]	SLE	PBMC; T cells (CD4/CD8); B cells and monocytes	Yes (flow fish)	ND	n = 22	No correlation between TL and disease activity
Wu [14]	SLE	PBMC => monocytes (MNC) Neutrophilic granulocytes (NG)	Yes	Yes	n = 60	In MNC and NG, telomeric erosion correlated to SLEDAI. No TA in NG
Katayama [9]	Mixed connective tissue disease	PBMC	ND	Yes	n = 11	Elevated TA
Yudoh [18]	RA	Blood and synovial peripheral lymphocytes	ND	Yes	n = 18	Elevated TA
Koetz [15]	RA	PBMC lymphocytes CD4 ⁺ (45RA ⁻ /45RO ⁺); CD8 ⁺	Yes	ND	n = 51	Telomeric erosion
Schönland [16]	RA	PBMC lymphocytes CD4 ⁺ (45RA ⁻ /45RO ⁺)	Yes	Yes	n = 37	Premature telomeric erosion in presence of DRB1 04HLA
Steer [17]	RA	PBMC	Yes	ND	n = 176	Telomeric erosion independent from length and severity of RA
Tarhan [13]	RA	PBMC	ND	Yes	n = 10	Elevated TA
Colmegna [19]	RA	CD34 ⁺ hematopoietic precursor cells	Yes	ND	n = 25	Telomeric erosion
Fujii [20]	RA	Naïve CD4 ⁺ T cells	ND	Yes	n = 38	Impaired induction of TA in naïve CD4 ⁺ T cells
Guan [23]	Sarcoidosis	PBMC	Yes	ND	n = 111	Telomeric erosion
Vogt [21]	Wegener's granulomatosis	PBMC	Yes	Yes	n = 22	No TA
Tarhan [13]	Systemic sclerosis	PBMC	ND	Yes	n = 19	Telomeric erosion
Artlett [24]	Systemic sclerosis	Lymphocytes	Yes	ND	n = 43 and 183 relatives	Decreased TA Telomeric erosion among patients and healthy parents
Katayama [9]	Systemic sclerosis	PBMC	ND	Yes	n = 9	TA identical to controls
MacIntyre [25]	Limited systemic sclerosis	PBMC	Yes	ND	n = 43	In limited sclerosis: telomere are longer than controls
Tarhan [13]	Sjögren's syndrome	PBMC	ND	Yes	n = 14	Elevated TA
Katayama [9]	Sjögren's syndrome	PBMC	ND	Yes	n = 11	Elevated TA
Kurosaka [27]	Adult-onset Still's disease	PBMC	ND	Yes	n = 2	Elevated TA correlated to disease activity
Prelog [26]	Juvenile idiopathic arthritis	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T cells	Yes	No	n = 22	Increased telomeric erosion in CD4 ⁺ CD45RA ⁺ naïve T cells
Morosetti [28]	Inclusion-body myositis	Primary muscle cells	Yes	ND	n = 8	Telomeric erosion
Wu [29]	Atopic dermatitis (D) and psoriasis (P)	PBMC, lymphocytes CD4 ⁺ (45RA ⁻ /45RO ⁺); CD8 ⁺ (28 ⁻ /28 ⁺)	Yes	Yes	D: n = 32 P: n = 16	Elevated TA (CD4 ⁺ T cells) Telomeric erosion (memory T cells)
Sasaki [30]	Primitive biliary cirrhosis	Biliary epithelial cells	Yes	ND	n = 13	Telomeric erosion compared to normal bile ducts cells
Tsakiri [32]	Idiopathic pulmonary fibrosis	PBMC	Yes	Yes		Telomeric erosion No TA Identification of TERT or TERC mutations
Armanios [31]	Idiopathic pulmonary fibrosis	PBMC	Yes	Yes		Telomeric erosion No TA Identification of TERT or TERC mutations
Jeanlos [33]	Type I diabetes	PBMC	Yes	ND	n = 54	Telomeric erosion
Fyhrquist [35]	Type I diabetes	Whole blood	Yes	ND	n = 132	Telomeric erosion among progressor patients

Abbreviations: ND: Not done; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells; RA: Rheumatoid arthritis; SLE: Systemic lupus erythematosus; SLEDAI: SLE Disease Activity Index; TA: Telomerase activity; TERT: Telomerase reverse transcriptase; TERC: Human telomerase RNA component; and TL: Telomere length.

among their healthy relatives [9,13,24]. Telomerase activity was decreased or identical to non-relatives controls. These results raise the possible role of an association of the telomere/telomerase system alteration together with environmental factors and/or a genetic

predisposition leading to disease development in these patients. Another group recently reported 43 patients with limited systemic sclerosis: telomere length did not differ significantly from that of healthy controls before 50 years of age, whereas it was even longer in

systemic sclerosis patients than controls after 50 years [25]. However, only patients with limited systemic sclerosis were enrolled in this study.

2.5. Juvenile idiopathic arthritis and adult-onset Still disease

One research team recently reported 22 patients with juvenile idiopathic arthritis [26], by studying telomere length of peripheral naive CD4⁺CD45RA⁺ T cells. Patients showed shorter telomere length than controls suggesting that the patient's T cells underwent age-inappropriate senescence. Kurosaka et al. found increased telomerase activity correlated to the disease activity in PBMC of two patients with adult-onset Still disease [27].

2.6. Myositis, psoriasis and atopic dermatitis

Morosetti et al. studied telomere in primary muscular cells from 8 patients with inclusion-body myositis [28]. When compared to control cells, the proliferative rate of patients's cells was decreased ($p < 0.05$), thus indicating that proliferative capacity of sporadic inclusion-body-myositis muscle cells becomes exhausted earlier. The telomere length of these cells was shorter than controls ($p < 0.02$), suggesting premature senescence. Therefore, these patients's myoblasts seem to have a constitutively impaired regenerative capacity.

Lymphocytes from 32 subjects with atopic dermatitis and 16 patients with psoriasis were studied [29]. Telomere erosion and increased telomerase activity were found in CD4⁺ T cells, predominantly in memory T cells, in comparison with controls.

2.7. Primary biliary cirrhosis

Telomere length were significantly shortened in biliary epithelial cells of the most damaged bile ducts of patients with primary biliary cirrhosis when compared to normal liver ($n = 13$, $p < 0.01$) [30]. Telomere dysfunction, detected through DNA damage was also studied: γ H2AX-DNA damage foci in these patients's small bile ducts and bile ductules were present in 55.6% ($n = 133$) versus almost none of the control normal livers ($p < 0.01$). These results, showing telomere shortening and an accumulation of DNA damage in damaged bile ducts, characterize biliary cellular senescence and may play a role in the following progressive bile duct loss in primary biliary cirrhosis.

2.8. Idiopathic pulmonary fibrosis

Recently, two research teams identified mutations in telomerase complex genes (*hTERT* and *hTR*) [31,32] in idiopathic pulmonary fibrosis. Armanios et al. reported heterozygous mutations of *hTERT* ($n = 5$) and *hTR* ($n = 1$) among 6 patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis [31]. These patients presented PBMC's shortened telomere compared to age-matched controls ($p < 0.006$) and altered telomerase activity. Tsakiri et al. analyzed 46 families with idiopathic interstitial lung disease and also identified heterozygous mutations in *hTERT* or *hTR* in 12% of their cohort [32]. When compared to age-matched controls, their mutated patients also displayed shortened telomere length.

2.9. Autoimmune diabetes

In type I diabetes, PBMC from 54 patients were compared to controls and type II diabetic patients: telomere erosion was found specifically in type I diabetes and not in type II diabetes [33]. Indeed, the phenomenon could not be related to hyperglycemia but to autoimmunity by a still unknown mechanism. Very recently, Fyhrius et al. analyzed the telomere length of whole blood of 132 patients compared to 44 healthy controls. They found out that short

telomeres were an independent predictor factor of diabetic nephropathy progression.

In summary, the telomere length of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is shorter, when compared to age-matched healthy controls, in patients with systemic lupus erythematosus [7,8,11,12,14], rheumatoid arthritis [15–17,34], Wegener's granulomatosis [21], sarcoidosis [23], systemic sclerosis [24], idiopathic pulmonary fibrosis [31,32] and type I diabetes [33,35]. The same phenomenon is observed among specific cell subsets as follows: naive TCD4⁺C45RA⁺ cells in juvenile idiopathic arthritis [26]; TCD4⁺, TCD8⁺ and CD34⁺ cells in rheumatoid arthritis [15,16,19]; TCD28⁺ cells in Wegener's granulomatosis [21] as well as TCD4⁺ cells in psoriasis or atopic dermatitis [29]. Furthermore, the telomere length of specific target-tissue cells was also shorter in inclusion-body myositis (primary muscular cells) [28] and in primary biliary cirrhosis (biliary epithelial cells of the most damaged bile ducts) [30].

Thus, it seems clear from these studies that a general pattern of increased telomere shortening characterizes cells of patients suffering from systemic disease.

3. Possible reasons of telomeric erosion

In all the aforementioned pathologies, there is often an associated inflammatory syndrome, which can lead to cellular oxidative stress. On the other hand, an increased leucocyte renewal in patients with systemic immune-mediated diseases could also contribute to the acceleration of telomere shortening.

Concurrently, there may be a suboptimal telomerase activity in most of these pathologies. Indeed, an elevated level of telomerase activity was found in PBMC of patients with systemic lupus erythematosus [7–13,36], connective tissue disease [9,13], rheumatoid arthritis [13,16,18] (while decreased telomerase activity was measured in their naive TCD4⁺ cells [20]) and Sjögren's syndrome [9,13] as well as in TCD4⁺ cells of patients with psoriasis and atopic dermatitis [29]. By contrast, telomerase activity was not detected in PBMC from Wegener's patients [21] and was decreased among patients with systemic sclerosis [24] or idiopathic pulmonary fibrosis [31,32] when compared to healthy age-matched controls.

Lastly, accelerated telomere erosion could be due to chronic stress exposure. The recently Nobelized Elisabeth Blackburn has worked with psychiatrists and has found out that chronic stress is correlated to short leukocyte telomere length, a phenomenon attributed to higher levels of oxidative stress at the cellular level [37]. Indeed, the group of patients with the highest psychological stress presented shorter telomeres and lower telomerase activity in their PBMC when compared to the low stress-group of patients. These elements suggest that psychological functions could have a direct impact on the telomere/telomerase system. Autoimmune diseases are often chronic and affect young patients, which means that patients have to live with their disease for many years or even all their life. Such a condition can influence their psychological balance and be responsible for stressful conditions, which could in turn be responsible for increased telomeric erosion in PBMC, as seen in these pathologies.

4. Consequences of telomeric erosion

In the past years, it has become clear that telomeres are directly responsible for sustained DNA damage signals in senescent cells, and DNA damage foci localized on telomeres in senescent cells can readily be detected *in vivo* [38–40]. DNA damage signals can originate from short telomeres and contribute to p53 or pRb activation leading to DNA damage repair [39,40], apoptosis or permanent cell-cycle arrest corresponding to a senescent state of the cell. This phenomenon, which contributes to safeguard the genome and cell integrity, may, when exaggerated, lead to premature senescence and tissue

degeneration. By contrast, inhibition of apoptosis or senescence can lead to cell modifications resulting in loss of tolerance of the immune system.

The connection between the telomere/telomerase system dysfunction and the previously described systemic immune-mediated diseases has not yet been clearly established. However, it has been hypothesized that telomeric erosion could lead to accelerated senescence of the immune system [41], in particular in lymphocytes subpopulations. Thus, if premature immunosenescence affects differently naive and effector T cells and that autoreactive T cells survive longer than other T cells including regulatory clones, cytotoxic autoaggressive lesions could occur [20]. In addition, escape of senescent effector T cells from the regulatory confines of the normal immune system may induce cytotoxic activities responsible for tissues destructions. Finally, replicative senescence of regulatory T cells could cause deficiency of anti-inflammatory and anti-autoimmune processes. However, studies are currently missing specifically addressing the question of telomere length/telomerase activity in regulatory T cells. Therefore, it would be interesting to assess telomere length and telomerase activity in regulatory T cells of patients with such diseases.

In addition, apoptosis clearance deficiencies that could induce the loss of tolerance in lymphoid tissues were pointed out in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [42–44].

It is also interesting to note that premature tissue degeneration is observed in autoimmune diseases, such as primary biliary cirrhosis (biliary ducts damages) [30], inclusion-body myositis (primary muscular cells) [28] and/or rheumatic arthritis (joint) [18]. Interestingly, these pathologies are characterized by an inflammatory process initiated by the immune cells on target tissues during which free radicals get liberated, perhaps damaging telomeres and increasing their erosion rate [5]. Interestingly, telomere dysfunction, detected through DNA damage was studied in primary biliary cirrhosis: γ H2AX-DNA damage foci in these patients' small bile ducts and bile ductules were present in 55.6% ($n=133$) versus almost none of the control normal livers ($p<0.01$). These results, showing telomere shortening and an accumulation of γ H2AX-DNA damage foci in the most damaged bile ducts as well as expression of p21^{WAF1/Cip} and p16^{INK4a}, could indicate premature biliary cellular senescence, which may play a role in the progressive bile duct

loss in primary biliary cirrhosis. Such a phenomenon, in absence of a sufficient telomerase activity, could alter the tissue regeneration process leading to premature organ degradation and dysfunction when compared to healthy age-matched individuals. It would then be interesting to measure telomere length in the different target tissues during such diseases.

5. Conclusion

The analysis of the literature relating the telomere/telomerase system to systemic immune-mediated diseases suggests that this system could be involved through different mechanisms, which are summarized in Fig. 1. An accelerated telomeric erosion in PBMC could result from chronic stress exposure, increased oxidative stress and/or suboptimal telomerase activity in a context of high PBMC renewal. This could result in a premature senescence of immune cells and specific target-tissue cells. These observations could be extended to prospective studies among large populations with easy, reproducible and comparable techniques measuring telomere length and telomerase activity, in order to better elucidate the involvement of the telomere/telomerase system in the pathophysiology of systemic immune-mediated diseases. In the future, these works could lead to new therapeutic strategies for these diseases, which often have neither specific nor curative treatments.

Take-home messages

- The telomere/telomerase system plays many roles, including protection of the genome integrity and regulating cellular aging and cell lifespan.
- In peripheral blood mononuclear cells of patients with autoimmune and systemic immune-mediated diseases, telomeres are shortened.
- In these diseases, telomeric erosion could result from
 - a. chronic psychological stress exposure
 - b. inflammation and thus increased oxidative stress
 - c. absent or inadequate telomerase activity
- Alteration of the telomere/telomerase system in autoimmune diseases could reflect premature senescence of immune cells and specific tissue-target cells.

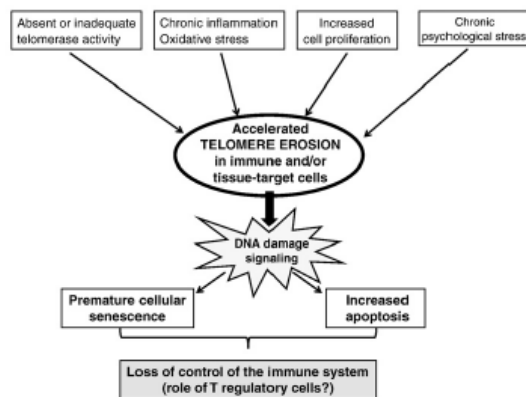


Fig. 1. A Proposed model for the telomere/telomerase system's potential involvement in the pathophysiology of "systemic diseases". Several elements, including absent or inadequate telomerase activity, chronic inflammation (and thus oxidative stress), increased cell proliferation and chronic psychological stress, could affect cellular telomere length in immune and/or tissue-target cells. In these cells, telomere erosion could lead to premature cellular senescence and increased apoptosis, possibly by the DNA damage signaling pathway. All together, these cellular phenomenon could be responsible of a loss of control of the immune system in which the role of regulatory T cells remains to be evaluated.

Conflict of interest

There was none declared.

Acknowledgements

S. Georgin-Lavialle is a recipient of a Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) grant and is supported by the Centre National pour la recherche Scientifique (CNRS) and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

A.-S. Gabet is supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR).

References

- [1] Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991 Apr 18;350(6319):569–73.
- [2] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405–13.
- [3] Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992 Jul-Aug;27(4):375–82.
- [4] Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:531–57.
- [5] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002 Jul;27(7):339–44.
- [6] Beier F, Balabanov S, Amberger CC, Hartmann U, Manger K, Dietz K, et al. Telomere length analysis in monocytes and lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus using multi-color flow-FISH. *Lupus* 2007;16(12):955–62.

- [7] Fritsch RD, Shen X, Illei GG, Yarboro CH, Prussin C, Hathcock KS, et al. Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006 Jul;54(7):2184–97.
- [8] Honda M, Mengesha E, Albano S, Nichols WS, Wallace DJ, Metzger A, et al. Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(10) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2001 May;99(2):211–21.
- [9] Katayama Y, Kohriyama K. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of systemic connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2001 Feb;28(2):288–91.
- [10] Klapper W, Moosig F, Sotnikova A, Qian W, Schröder J, Parwaresch R. Telomerase activity in B and T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004 Dec;63(12):1681–3.
- [11] Kurosaka D, Yasuda J, Yoshida K, Yokoyama T, Ozawa Y, Obayashi Y, et al. Telomerase activity and telomere length of peripheral blood mononuclear cells in SLE patients. *Lupus* 2003;12(8):591–9.
- [12] Kurosaka D, Yasuda J, Yoshida K, Yoneda A, Yasuda C, Kingetsu I, et al. Abnormal telomerase activity and telomere length in T and B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006 Jun;33(6):1102–7.
- [13] Tarhan F, Vural F, Kosova B, Aksu K, Cogulu O, Keser G, et al. Telomerase activity in connective tissue diseases: elevated in rheumatoid arthritis, but markedly decreased in systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2007 Oct 16.
- [14] Wu CH, Hsieh SC, Li KJ, Lu MC, Yu CL. Premature telomere shortening in polymorphonuclear neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus is related to the lupus disease activity. *Lupus* 2007;16(4):265–72.
- [15] Koetz K, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1;97(16):9203–8.
- [16] Schonland SO, Lopez C, Widmann T, Zimmer J, Bryl E, Goronzy JJ, et al. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Nov 11;100(23):13471–6.
- [17] Steer SE, Williams FM, Kato B, Gardner JP, Norman PJ, Hall MA, et al. Reduced telomere length in rheumatoid arthritis is independent of disease activity and duration. *Ann Rheum Dis* 2007 Apr;66(4):476–80.
- [18] Yudoh K, Matsuno H, Nezu T, Kimura T. Different mechanisms of synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis and pigmented villonodular synovitis: the role of telomerase activity in synovial proliferation. *Arthritis Rheum* 1999 Apr;42(4):669–77.
- [19] Colmegna I, Diaz-Borjon A, Fujii H, Schaefer I, Goronzy JJ, Weyand CM. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008 Apr;58(4):990–1000.
- [20] Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Mar 2.
- [21] Vogt S, Iking-Konert C, Hug F, Andrassy K, Hansch GM. Shortening of telomeres: Evidence for replicative senescence of T cells derived from patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 2003 Jun;63(6):2144–51.
- [22] Lamprecht P. Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clin Exp Immunol* 2005 Aug;141(2):201–10.
- [23] Guan JZ, Maeda T, Sugano M, Oyama J, Higuchi Y, Suzuki T, et al. An analysis of telomere length in sarcoidosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007 Nov;62(11):1199–203.
- [24] Artlett CM, Black CM, Briggs DC, Stevens CO, Welsh KI. Telomere reduction in scleroderma patients: a possible cause for chromosomal instability. *Br J Rheumatol* 1996 Aug;35(8):732–7.
- [25] MacIntyre A, Brouillette SW, Lamb K, Radhakrishnan K, McGlynn I, Chee MM, et al. Association of increased telomere lengths in limited scleroderma, with a lack of age-related telomere erosion. *Ann Rheum Dis* 2008 Dec;67(12):1780–2.
- [26] Prelog M, Schwarzenbrunner N, Sailer-Hock M, Kern H, Klein-Franke A, Auserlechner MJ, et al. Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008 Jul;58(7):2153–62.
- [27] Kurosaka D, Yasuda J, Kingetsu I, Yasuda C, Yoshida K, Toyokawa Y, et al. Two cases of adult Still's disease with abnormally high level of telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Mod Rheumatol* 2004;14(5):394–8.
- [28] Morosetti R, Broccolini A, Sancricca C, Gliubizzi C, Gidaro T, Tonali PA, et al. Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol Aging* 2008 Sep 25.
- [29] Wu K, Higashi N, Hansen ER, Lund M, Bang K, Thøgersen-Pedersen K. Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J Immunol* 2000 Oct 15;165(8):4742–7.
- [30] Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Nakada S, Nakanuma Y. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 2008 Jul;48(1):186–95.
- [31] Amninos MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007 Mar 29;356(13):1317–26.
- [32] Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 May 1;104(18):7552–7.
- [33] Jeanclos E, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Warram JH, et al. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 1998 Mar;47(3):482–6.
- [34] Salmon M, Akbar AN. Telomere erosion: a new link between HLA DR4 and rheumatoid arthritis? *Trends Immunol* 2004 Jul;25(7):339–41.
- [35] Pyhrquist F, Tiitu A, Saijonmaa O, Forsblom C, Groop PH. Telomere length and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *J Intern Med* 2009 Jun 4.
- [36] Kurosaka D, Ozawa Y, Yasuda J, Yamada A, Akiyama M, Saito S, et al. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis* 2001 Dec;60(12):1158–9.
- [37] Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Dec 7;101(49):17312–5.
- [38] Aubert G, Lansdorf PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev* 2008 Apr;88(2):557–79.
- [39] d'Adda di Fagnana F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Hegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003 Nov 13;426(6963):194–8.
- [40] Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003 Sep 2;13(17):1549–56.
- [41] Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol* 2006 Mar;41(3):246–51.
- [42] Janko C, Schorn C, Grossmayer GE, Frey B, Herrmann M, Gaipal US, et al. Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev* 2008 Oct;8(1):9–12.
- [43] Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 2006 Oct 26;443(7114):998–1002.
- [44] Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, van der Vlag J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17(5):371–5.



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Mise au point

Télomères et télomérase : intérêts et perspectives dans le lupus érythémateux systémique

Telomeres and telomerase: Relevance and future prospects in systemic lupus erythematosus

S. Georgin-Lavialle, A. Aouba, Y. Lepelletier, A.-S. Gabet, O. Hermine*

Service d'hématologie adultes, hôpital Necker, UMR CNRS 8147, centre de référence des mastocytoses, faculté de médecine, université Paris Descartes, 161, rue de Sèvres, 75015 Paris, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 2 avril 2010

Mots clés :
Télomères
Télomérase
Traitement
Lupus érythémateux systémique
Apoptose

R É S U M É

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques spécialisées qui coiffent et protègent l'extrémité des chromosomes et dont la taille se réduit à chaque division cellulaire. Lorsqu'ils atteignent une taille critique, la cellule entre en sénescence à moins qu'intervienne une enzyme, la télomérase, capable de les allonger. En cancérologie, la réactivation de la télomérase entraîne l'immortalisation des cellules. Ainsi, cette enzyme fait l'objet de recherches intensives depuis une quinzaine d'années afin de déterminer des cibles thérapeutiques nouvelles. Le stress oxydatif, l'inflammation et l'augmentation du renouvellement des leucocytes sont des facteurs environnementaux majeurs associés à une accélération du raccourcissement des télomères et de l'âge biologique. De plus, l'érosion télomérique entraîne l'apoptose des cellules, or, l'élimination des corps apoptotiques est altérée dans le lupus. Compte tenu de ces éléments, une revue de la littérature sur l'implication du système télomères/télomérase dans la maladie lupique a été réalisée afin d'en discuter les intérêts en physiopathologie. L'étude des cellules mononucléées du sang chez 273 patients lupiques montre une érosion télomérique. Dans les lymphocytes, l'activité télomérasique est augmentée et corrélée à l'activité de la maladie. L'érosion des télomères, insuffisamment compensée par l'augmentation de l'activité télomérasique, semble refléter une sénescence répliquative accélérée du système immunitaire ; le rôle des lymphocytes T régulateurs restant à préciser. L'étude de la longueur des télomères et de l'activité télomérasique pourrait être utile dans le futur comme facteur pronostic ou comme marqueur d'activité de la maladie. Des études standardisées sur de plus amples effectifs pourraient être envisagées dans la maladie lupique et ouvrir de nouvelles voies de recherche et de thérapeutique basées sur la biologie des télomères.

© 2010 Publié par Elsevier Masson SAS pour la Société nationale française de médecine interne (SNFMI).

A B S T R A C T

Telomeres are specialized structures that cap and protect the end of chromosomes. Telomeres progressively shorten after each cellular division unless an enzyme, the telomerase, counteracts. Telomeres are implicated in cellular senescence, acting like a biological clock. Telomere length and telomerase activity are important in the physiopathology of cancer. In the past years, research has focused on them in order to find new therapeutic targets. Yet, oxidative stress, inflammation and increased leucocytes renewal are major environmental factors associated with telomeres shortening acceleration and thus in concordance with biological age. Thus, telomeric erosion induces cell apoptosis; indeed, apoptotic cell clearance is impaired in systemic lupus. Considering these elements and data resulting from oncology, telomere/telomerase couple was studied during the last decade in systemic lupus erythematosus. The objective was to know if this couple could have an implication in the physiopathology of this disease. A systematic review of literature is proposed about telomere and/or telomerase in systemic lupus erythematosus in order to discuss their physiopathological implication. Among 273 tested patients, telomere seems to be eroded and telomerase activity insufficiently increased but correlated to the activity of the disease. The analysis of telomere length and telomerase activity could be useful as prognosis factor or

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : ohermine@gmail.com (O. Hermine).

disease activity index. Telomere erosion could reflect an accelerated replicative senescence of the immune system. The role of the regulator T lymphocytes has not yet been precised. Standardized studies on larger population could be realized in systemic lupus and open new avenues of research and/or therapy based upon the telomere/telomerase biology.

© 2010 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of the Société nationale française de médecine interne (SNFMI).

1. Structure et fonctions des télomères et de la télomérase

1.1. Les télomères et la télomérase

Les télomères sont constitués de plusieurs centaines de répétitions nucléotidiques de séquences 5'-TTAGGG-3' associées à des protéines. La taille moyenne des télomères varie chez l'homme de 10 à 15 kilobases [1]. Les télomères ont au moins deux fonctions : protéger les extrémités chromosomiques d'une dégradation de l'ADN par les exonucléases et prévenir les fusions de deux extrémités de chromosome capables d'entraîner des cassures et des recombinaisons chromosomiques [2].

La longueur des télomères diminue à chaque division cellulaire du fait de l'incapacité de la ADN polymérase à répliquer complètement les extrémités terminales d'une molécule d'ADN linéaire. La télomérase est une enzyme de type reverse transcriptase capable d'ajouter des séquences TTAGGG aux extrémités 3' des chromosomes, compensant ainsi la perte de longueur télomérique [3]. La télomérase est composée de deux éléments nécessaires à son activité : une sous-unité catalytique protéique portant l'activité transcriptase inverse (*human telomerase reverse*

transcriptase [hTERT]) et un ARN matriciel (*human telomerase RNA* [hTR], encore appelé, *telomerase RNA component* [TERC]) qui présente un motif complémentaire aux répétitions télomériques. Ce dernier est susceptible d'être partiellement rétro-transcrit par hTERT, conduisant ainsi à l'addition d'une ou plusieurs copies du motif CGGTTAG à l'extrémité 3' de l'ADN (Fig. 1) [4]. Contrairement à hTR, la sous-unité hTERT n'est pas exprimée constitutivement dans toutes les cellules et plusieurs études ont montré que son expression est fortement corrélée à l'activité de l'enzyme télomérase [5]. Ainsi, la télomérase est présente et active dans les cellules de la lignée germinale et les cellules souches, mais est absente ou très faiblement exprimée dans les cellules somatiques adultes [6].

1.2. L'horloge télomérique

Depuis 15 ans, il a été montré que les télomères sont des régulateurs essentiels de la durée de vie des cellules et que l'on peut mesurer l'âge d'une cellule par la perte d'ADN télomérique [7]. Les cellules humaines normales ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois in vitro, jusqu'à atteindre une limite proliférative irréversible que l'on nomme « barrière de Hayflick » ou stade M1 [8]. Les

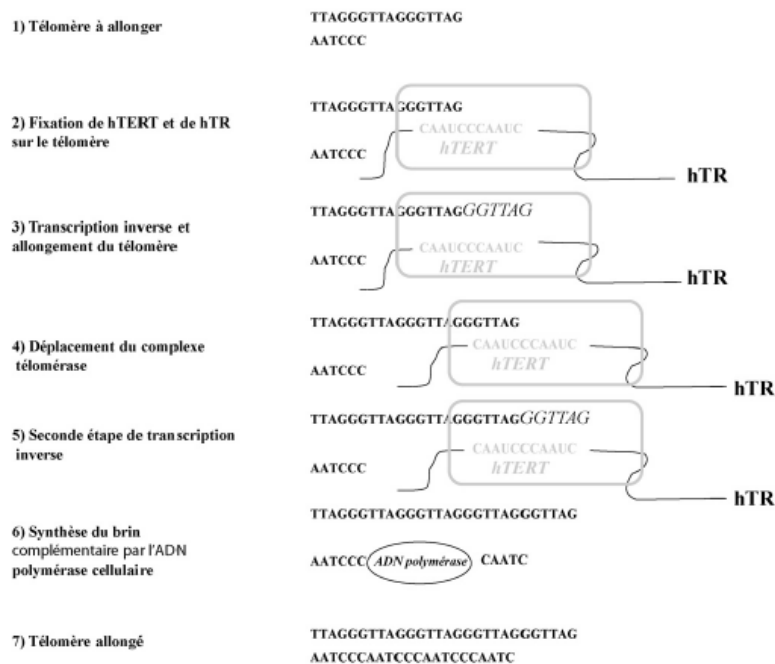


Fig. 1. Représentation schématique de l'allongement d'un télomère par le complexe télomérase. Les télomères sont constitués de séquences répétitives TTAGGG et de protéines associées. Le complexe de l'enzyme télomérase est au minimum composé de deux sous-unités : une protéine (hTERT) et un ARN (hTR). hTR sert de matrice pour l'ajout de motifs répétitifs TTAGGG par la télomérase aux extrémités chromosomiques. Grâce à son activité *reverse transcriptase*, la télomérase catalyse l'addition des répétitions télomériques à l'extrémité des chromosomes sur le brin riche en guanine. Le brin complémentaire est ensuite synthétisé par l'ADN polymérase selon le processus normal de réplication de l'ADN.

cellules sont alors toujours viables malgré des modifications morphologiques et l'altération de bons nombres de leurs fonctions : elles sont en sénescence répllicative. Cet arrêt prolifératif en phase G1 du cycle cellulaire survient en réponse à divers stimuli dont le raccourcissement critique ou la désorganisation d'un ou plusieurs télomères au sein de la cellule. La sénescence répllicative des cellules humaines en culture est un phénomène qui se trouve sous la dépendance des voies p16/pRb et p53 qui participent à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. L'abolition simultanée de ces deux points de contrôle du cycle cellulaire permet un échappement à l'étape de sénescence et la poursuite des mitoses et de l'érosion télomérique qui en découle. Les télomères deviennent alors instables et les cellules entrent dans une phase dite « de crise », encore appelée stade *mortality stage 2* (M2), caractérisée par une forte instabilité génétique et une mort cellulaire massive. En effet, les dysfonctions télomériques sont alors tellement sévères que la majorité des cellules ne peut y survivre. On estime pourtant que quelques cellules peuvent survivre à cette étape et à terme s'immortaliser [9]. En effet, certaines cellules vont pouvoir à ce stade réactiver des mécanismes autorisant une stabilisation des télomères et du génome, ce qui leur confère un avantage prolifératif. Il peut s'agir par exemple d'une réactivation de la télomérase ou du mécanisme *alternative lengthening of telomeres* (ALT) impliquant des phénomènes de recombinaisons homologues et permettant l'élongation des télomères indépendamment de la télomérase [5,10].

1.3. Techniques d'étude des télomères

1.3.1. Mesure de l'activité télomérasique

La détection in vitro de l'activité télomérasique dans des échantillons biologiques peut être effectuée grâce à la méthode dite du *telomere repeat amplification protocol* (TRAP) [11]. Cette méthode peut être semi-quantitative ou quantitative [12].

1.3.2. Mesure de la longueur des télomères

La technique de référence est le Southern blot qui permet de mesurer de la longueur moyenne des télomères d'une population cellulaire donnée [13]. Plus récemment, une méthode plus précise utilisant la cytométrie en flux a été développée : le Flow-FISH [14].

1.4. Implications fondamentales et perspectives thérapeutiques en cancérologie

Plusieurs mécanismes impliquant le couple télomères/télomérase sont associés à l'oncogenèse. Premièrement, l'immortalisation cellulaire est souvent liée à la surexpression de la télomérase. Ainsi, une surexpression d'hTERT est constatée dans plus de 85% des cancers [11]. De plus, les souris dépourvues de télomérase sont résistantes à la carcinogenèse chimio-induite [15]. Deuxièmement, en l'absence de télomérase, ou en contexte d'activité télomérase suboptimale, les télomères raccourcissent excessivement et deviennent instables. Une telle instabilité en association avec l'inactivation des mécanismes de surveillance des dommages à l'ADN (impliquant les gènes *p53* et *pRb* notamment) favorise l'apparition d'anomalies chromosomiques (comme les fusions de deux extrémités, des additions ou délétions de portions de chromosomes) [16]. Cette instabilité génétique pourrait induire à terme des altérations de l'expression d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs (Fig. 2) et ainsi jouer un rôle important dans la survenue de cancers [17]. Compte tenu des propriétés biologiques essentielles des télomères dans le contrôle de l'intégrité du génome et de leur rôle lors des processus de sénescence cellulaire et de développement tumoral, ces structures sont devenues un centre d'intérêt majeur des scientifiques ces dernières années. Plusieurs approches thérapeutiques ont été

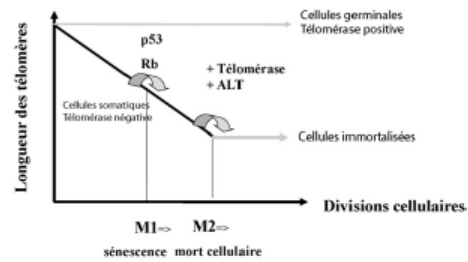


Fig. 2. Graphique représentant la taille des télomères en fonction du nombre de divisions cellulaires pour différents types de cellules. À chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent. Quand les télomères atteignent une taille critique, le point de contrôle mortalité 1 (M1) est atteint et la cellule entre en sénescence. Le point M1 peut être court-circuité par l'inactivation des voies p53 et/ou Rb. Dans ce cas, les cellules continuent de se diviser avec persistance de l'érosion des télomères. Lorsque ces dernières atteignent une taille critique, des événements comme cassure de l'ADN, Recombinaison et fusion des extrémités chromosomiques peuvent survenir. Une telle instabilité génomique déclenche le passage au point de contrôle mortalité 2 (M2) et entraîne la mort des cellules. De rares cellules en culture contournent le point M2 en activant le maintien des télomères par un mécanisme de maintenance : soit l'enzyme télomérase, soit un mécanisme de recombinaison appelé *alternative lengthening of telomeres* (ALT).

proposées, visant, d'une part, la télomérase via hTERT et hTR et, d'autre part, le télomère lui-même [18–20].

2. Relation entre le système télomère/télomérase et le lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune chronique, non spécifique d'organe. Sa présentation clinique, très polymorphe, associe l'atteinte inflammatoire de différents organes, tels que la peau, les articulations, les reins, les séreuses et le système nerveux central et la présence, dans la majorité des cas, d'anticorps dirigés contre l'ADN ou différentes molécules du noyau cellulaire. La ou les causes du LES restent inconnues ; il semble cependant qu'un dysfonctionnement du système immunitaire est au cœur de sa physiopathologie. La survenue de cette maladie complexe est déterminée par la combinaison des facteurs multigéniques, environnementaux et stochastiques [21].

Dans les maladies auto-immunes, l'érosion des télomères et l'augmentation de l'activité télomérasique semblent refléter une sénescence répllicative accélérée du système immunitaire et/ou son activation dysfonctionnelle [22]. Le stress oxydatif, l'inflammation et le renouvellement accru des leucocytes sont des facteurs environnementaux majeurs associés à une accélération du raccourcissement des télomères [23], pouvant entraîner à terme, un vieillissement prématuré du système immunitaire. Récemment, il a été mis en évidence que la reconnaissance spécifique et la résorption des cellules apoptotiques par les macrophages était déficiente au cours du LES à la différence du sujet sain où l'élimination des corps apoptotiques est rapide et efficace [24]. L'érosion télomérique comme décrit plus haut conduit les cellules à la mort par apoptose dans la majeure partie des cas. Ainsi, au cours des pathologies auto-immunes, et notamment du LES, le système télomère/télomérase pourrait jouer un rôle pathogénique par différents mécanismes.

À la lumière de ces éléments et des données issues de la cancérologie, le système télomère/télomérase a été étudié depuis 2001 par plusieurs équipes dans le LES, afin de savoir si ce système pouvait avoir une implication dans la physiopathologie de cette maladie. Nous proposons ici une revue discutée des données de la littérature concernant le rôle du couple télomères/télomérase dans la mala-

die lupique. Après un rappel sur les aspects fondamentaux de ce système, une revue de la littérature sera proposée. Celle-ci a été effectuée en consultant la base de données PubMed® et en associant *telomere*, *telomere length* ou *telomerase* respectivement aux mots suivants : *connective tissue disease*, *systemic lupus erythematosus*. Puis, nous discuterons les intérêts et perspectives potentiels du couple télomère/télomérase dans la pathogénie et la prise en charge de cette affection.

3. Revue de la littérature

Les études citées ont été volontairement analysées selon le type cellulaire étudié afin de mieux comprendre l'implication du système télomères/télomérase dans les mécanismes immunopathogéniques de la maladie (Tableau 1). Deux populations ethniques ont principalement été étudiées : asiatique (Japon et Taïwan) et européenne (Allemagne et Turquie). Dans chaque étude, les témoins sains ont été appariés aux patients en fonction de leur âge, étant donné que les télomères raccourcissent physiologiquement avec l'âge.

3.1. Cellules mononucléées du sang (PBMC) et polynucléaires neutrophiles

En 2001, trois équipes japonaises se sont intéressées à des patients lupiques. Honda et al. [25] ont étudié la longueur des télomères et l'activité télomérasique chez 58 patients et 51 témoins. La longueur des télomères est retrouvée significativement raccourcie par rapport aux témoins, surtout chez les patients âgés de moins de 45 ans. Il n'existe pas de corrélation entre la longueur des télomères et la durée de la maladie. Aucune activité télomérasique n'a été retrouvée dans les PBMC frais. Kurosaka et al. [26] ont étudié l'activité télomérasique chez 13 patients comparés à dix témoins sains. Ils montrent qu'elle est significativement plus élevée chez les sujets lupiques par rapport aux témoins. L'activité télomérasique est également plus élevée chez les patients non traités que chez les patients traités et est corrélée à l'index d'activité de la maladie (SLEDAI). Elle diminue en cas d'efficacité thérapeutique ou de diminution du SLEDAI. Katayama et Kohriyama [27] ont mesuré l'activité télomérasique chez sept sujets atteints de LES comparés à dix témoins ; celle-ci est significativement plus élevée chez les

sujets lupiques par rapport aux témoins, et elle est aussi corrélée à un SLEDAI élevé.

En 2003, Kurosaka et al. [28] rapportent une nouvelle étude sur 55 patients comparés à 45 témoins. L'activité télomérasique est plus élevée au cours des LES actifs que chez les témoins ; elle est aussi élevée dans les LES inactifs mais uniquement chez les patients de plus de 50 ans. Il existe une corrélation entre l'activité télomérasique élevée et le SLEDAI modifié (M-SLEDAI) élevé ainsi qu'avec l'élévation de la CRP et la diminution de l'hémoglobine. La longueur des télomères a été mesurée chez 30 patients : les télomères sont raccourcis chez les patients lupiques âgés de moins de 40 ans comparativement aux sujets sains. Il n'existe pas de corrélation entre la longueur des télomères et les manifestations cliniques, d'une part, et l'activité télomérasique, d'autre part. Sur 15 patients, l'activité télomérasique a été mesurée au cours d'un traitement par corticoïdes : cette activité diminue sous corticothérapie en cas de SLEDAI initialement élevé.

En 2007, Wu et al. [29] ont étudié la longueur des télomères et l'activité télomérasique des PBMC et les polynucléaires neutrophiles de 53 patients lupiques à Taïwan. Les résultats étaient comparés à ceux obtenus chez 24 témoins sains. La longueur moyenne des télomères est significativement diminuée chez les patients dans les deux types cellulaires par rapport aux témoins et correspondait à une sénescence prématurée de 16,5 ans dans les PBMC et 13,4 ans dans les neutrophiles ; l'érosion télomérique est significativement accélérée chez les patients âgés de moins de 45 ans. Le SLEDAI est corrélé à l'érosion télomérique accélérée, surtout dans les neutrophiles, mais pas la durée de la maladie, la dose de corticoïdes, le taux des anticorps anti-ADN ni celui du complément. La longueur des télomères n'est pas différente dans les PBMC et les neutrophiles chez un même sujet. Cependant, chez 12 sujets ayant une leucopénie et une lymphopénie, les télomères sont significativement plus courts dans les PBMC que dans les neutrophiles. L'activité télomérasique est retrouvée absente dans les neutrophiles de certains patients ($n = 5$) et témoins ($n = 3$).

Beier et al. [30] publient un travail où la longueur des télomères est mesurée par Flow-FISH dans les PBMC de 22 patients et 20 témoins en Allemagne. Il n'y est pas été trouvé de différence significative entre les patients et les témoins. Il n'existe pas de corrélation entre l'activité de la maladie et la longueur des télomères.

Tableau 1

Revue de la littérature télomères/télomérase dans le lupus érythémateux systémique.

Auteur	Cellules étudiées	Étude longueur télomères (LT)	Mesure activité télomérase (AT)	Nombre de cas (n)	Résultats
Honda et al. [25]	PBMC	Oui	Oui	90	Érosion télomères sauf Ly T CD8+CD28– mémoires
Kurosaka et al. [26]	PBMC	Non	Oui	13	AT élevée et corrélée au SLEDAI
Katayama et Kohriyama [27]	PBMC	Non	Oui	17	AT élevée
Kurosaka et al. [28]	PBMC	Oui ($n = 30$)	Oui ($n = 55$)	30	Érosion télomères surtout jeunes patients
				55	AT corrélée au SLEDAI
Wu et al. [29]	PBMC : MNC, PNN	Oui	Oui	60	LT diminuée dans MNC et PNN
					Érosion télomères corrélée SLEDAI
					AT nulle dans PNN
					Possible effet traitement immuno-suppresseur sur LT
Beier et al. [30]	PBMC : Ly T (CD4/CD8), B et MNC	Oui	Non	22	Pas de corrélation LT et activité maladie
Tarhan et al. [31]	PBMC	Non	Oui	15	AT élevée
Kurosaka et al. [32]	PBMC, Ly T et B	Oui	Oui	34	AT élevée surtout dans Ly B et si SLEDAI élevé
					Ly T identique Ly B
Klapper et al. [33]	PBMC	Oui ($n = 5$)	Oui ($n = 9$)	5	AT élevée dans Ly B CD19+
				9	LT identique
Fritsch et al. [34]	Sous-populations lymphocytaires	Oui	Oui	7	Érosion des télomères lorsque les Ly T CD4+ naïfs se différencient

AT : activité de la télomérase ; Ly : lymphocyte ; LT : longueur des télomères ; MNC : monocyte ; PBMC : *peripheral blood mononuclear cells* (cellules mononucléées du sang périphérique) ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; SLEDAI : *SLE disease activity index* (score d'activité de la maladie dans le lupus).

Mais l'effectif étudié est plus faible et la technique de mesure de la longueur des télomères n'est pas la même que celle utilisée par les autres équipes (Flow-FISH versus Southern blot).

3.2. Lymphocytes

3.2.1. Lymphocytes totaux

En 2007 en Turquie, Tarhan et al. [31] ont mesuré l'activité télomérasique en PCR quantitative dans les lymphocytes sanguins de 15 sujets lupiques comparativement à 29 témoins sains. L'hypothèse testée était l'existence d'une corrélation entre l'activité de la maladie (SLEDAI) et l'activité télomérasique. Celle-ci est retrouvée plus élevée chez les patients lupiques (13,4 en moyenne) que chez les témoins sains (7,6 en moyenne), mais ce résultat n'est pas significatif. L'activité télomérasique est significativement plus élevée chez les patients lupiques ayant une arthrite active en comparaison avec ceux qui ne présentent pas cette manifestation.

Kurosaka et al., au Japon, rapportent en 2006 [32] un travail sur les lymphocytes T (CD3+) et B (CD19+) de 34 patients lupiques comparés à 17 témoins. Le SLEDAI est retrouvé élevé (seuil supérieur ou égal à 6) chez 18 patients et bas chez 16 patients. L'activité télomérasique a été mesurée chez tous les patients. Dans les lymphocytes T, elle est significativement plus élevée chez les patients que chez les témoins, sans être corrélée au SLEDAI et est retrouvée inférieure à celle des lymphocytes B. Dans ces derniers, elle est significativement plus élevée chez les patients avec un LES actif que chez les témoins et est corrélée au SLEDAI, ainsi qu'au taux sanguin des anticorps anti-ADN, du complément C3 et CH50 et des immunoglobulines G. La longueur des télomères a été mesurée chez 17 sujets. Les lymphocytes T des patients lupiques ont des télomères plus courts que les témoins, mais aucune différence n'est retrouvée dans les lymphocytes B. Au total, l'activité télomérasique est plus élevée dans les lymphocytes B (si le SLEDAI est élevé) que dans les lymphocytes T (quel que soit le SLEDAI) et cela de façon significative par rapport aux témoins.

En 2004, Klapper et al. en Allemagne [33] ont étudié les lymphocytes de neuf patients atteints de LES comparativement à ceux de neuf témoins sains appariés selon l'âge. Les PBMC des sujets étaient triés afin d'étudier plus précisément les lymphocytes T (CD4+ et CD8+), d'une part, et B (CD19+), d'autre part. L'activité télomérasique est retrouvée significativement augmentée dans les lymphocytes B des patients lupiques par rapport aux témoins, mais pas dans les lymphocytes T. La longueur des télomères n'est pas différente entre les sujets lupiques et les témoins sains, mais l'effectif étudié est faible ($n=5$).

3.2.2. Sous-populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+

Honda et al. [25] ont étudié la longueur des télomères et l'activité télomérasique des sous-populations lymphocytaires T de six patients lupiques. En comparaison avec des témoins sains, ils montrent que les lymphocytes T CD4+ des patients ont des télomères raccourcis par rapport à ceux mesurés dans les PBMC totaux ; ce résultat n'étant pas retrouvé dans les lymphocytes T CD8+. Dans cette dernière catégorie, les mémoires (CD28^{low}CD45RA⁻) ont une longueur télomérique conservée et une activité télomérasique élevée par rapport aux lymphocytes T CD8+ non mémoires (CD28⁺CD45RA⁺).

En 2006, au cours d'une étude sur la différenciation des lymphocytes T mémoires dans le LES, Fritsch et al. [34] ont mesuré la longueur des télomères (en Flow-FISH) des lymphocytes T chez sept patients lupiques allemands. Plus les lymphocytes T CD4+ acquièrent un phénotype mémoire, plus leurs télomères sont courts et plus l'activité télomérasique diminue. Cependant, en comparant la longueur des télomères de chaque sous-population de lymphocytes T CD4+, il n'existe pas de différence significative entre les patients et les témoins sains.

4. Discussion

Au total, l'étude des télomères et la télomérase de 273 patients avec un LES sont rapportées dans la littérature entre 2001 et 2007. Les auteurs les ont comparés à des témoins sains appariés en fonction de l'âge [25–34]. Dans les PBMC des patients lupiques, les télomères semblent être anormalement érodés et la télomérase insuffisamment réactivée pour compenser ce phénomène. Les études sur les lymphocytes et leurs sous-populations concernent des effectifs plus faibles, mais tendent à montrer que l'activité télomérasique pourrait être corrélée à l'activité de la maladie [26,27]. Les immunosuppresseurs semblent entraîner une diminution de l'activité télomérasique, mais ces résultats portent sur un petit nombre de patients [32]. Ces données suscitent plusieurs éléments de discussion et d'hypothèses physiopathologiques et potentiellement thérapeutiques.

L'interaction entre les télomères et les maladies auto-immunes comme le lupus ne sont pas encore très claires. Certains auteurs [25,34] attribuent le raccourcissement de la longueur des télomères à l'activation et la prolifération chronique des lymphocytes. Ce phénomène pourrait entraîner la sénescence prématurée des cellules immunitaires. La sénescence, impliquant la sortie du cycle mitotique et à terme la mort cellulaire, pourrait contribuer ainsi à la faible réponse aux nouveaux stimuli antigéniques et à la dérégulation de la réponse immunitaire. Ce phénomène serait analogue à celui que l'on observe au cours du vieillissement normal et qui serait dû au raccourcissement des télomères ; dans cette situation, il survient un épuisement immunitaire et une augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes [22]. De même, selon les résultats des études précédentes dans le LES, les cellules mononucléées du sang présenteraient des caractéristiques évocatrices de vieillissement prématuré du système immunitaire. Ainsi, la sénescence répliquative pourrait concerner les lymphocytes T régulateurs et entraîner un déficit des processus anti-dysimmunitaires ou anti-inflammatoires. Aucune étude n'a spécifiquement porté sur la sous-population des lymphocytes T régulateurs : un tel travail pourrait permettre de regarder s'ils sont aussi touchés par le phénomène de sénescence répliquative.

La plus forte activité télomérasique a été retrouvée dans les lymphocytes B [33], or il existe des perturbations de l'homéostasie lymphocytaire B au cours du LES et ces derniers produisent des auto-anticorps. L'érosion télomérique, associée à la prolifération lymphocytaire B, pourrait être compensée par une réactivation de la télomérase dans ces lymphocytes, permettant ainsi leur survie préférentielle (par rapport aux autres lymphocytes, T notamment) par conséquent de pérenniser la sécrétion des auto-anticorps retrouvés au cours du LES. Cette hypothèse serait en accord avec l'observation d'une activité télomérasique retrouvée augmentée en cas de maladie active [26–28,31,32] et corrélée au taux sanguin des anticorps anti-ADN [32]. Une étude approfondie des sous-populations B (naïves, mémoires et de la zone marginale) pourrait permettre d'approfondir l'implication du système télomère/télomérase dans la dérégulation fonctionnelle des lymphocytes B au cours du LES.

Concernant les lymphocytes T, il semble exister un paradoxe entre l'observation d'un raccourcissement des télomères et une certaine augmentation de l'activité télomérasique. L'activation constitutive de ces lymphocytes pourrait entraîner une augmentation significative de leur activité télomérasique, toutefois insuffisante pour compenser l'érosion télomérique associée à leur prolifération. Le phénomène d'érosion télomérique est commun à plusieurs autres maladies auto-immunes [22] et pourrait constituer un facteur d'instabilité chromosomique comme décrit dans des pathologies hématologiques [16].

Compte tenu de l'implication de la télomérase en cancérologie, une étude comparative de la longueur des télomères et de

l'activité télomérasique chez les patients lupiques développant ou non un cancer ou un lymphome pourrait être menée ; la maladie lupique ou ses thérapeutiques immunosuppressives paraissent en effet être un facteur de risque de survenue de pathologies malignes. Le LES survient parfois chez des sujets âgés [35,36], une comparaison de la longueur des télomères en fonction de l'âge de survenue de la maladie pourrait être envisagée chez les sujets lupiques. De même, les enfants, développant un LES au plus jeune âge, semblent développer une maladie plus sévère et pourraient constituer un sous-groupe très intéressant de l'étude de l'implication du système télomère/télomérase dans cette affection [37] ; des anomalies, notamment génétiques spécifiques du système télomères/télomérase pourraient être impliquées chez ces jeunes patients.

Le rôle joué par le stress oxydatif serait d'entraîner un raccourcissement des télomères [23]. Or, au cours du LES, il existe souvent une inflammation chronique. Celle-ci pourrait être responsable d'un stress oxydatif à l'origine de l'érosion télomérique retrouvée dans les PBMC.

Enfin, étant donné le rôle stimulateur des estrogènes sur la télomérase [38] et du fait que les femmes souffrent plus du LES que les hommes, il pourrait y avoir un lien entre le niveau de production estrogénique et le système télomère/télomérase au cours du LES.

Des travaux récents, résumés par Janko et al. ont montré qu'au cours du LES, le système d'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages était défectueux par rapport aux sujets sains [24]. De plus, il existe une accumulation de fragments nucléaires, secondaires au défaut de résorption des corps apoptotiques, dans les organes lymphoïdes secondaires des patients ayant un LES. Or, comme il s'agit du site de sélection des lymphocytes B, l'hypothèse émise est une perte de tolérance périphérique B entraînant par ailleurs la prolifération des lymphocytes T autoréactifs. L'origine de ce phénomène n'est pas encore connue ni si ces corps apoptotiques résultent d'une apoptose accrue chez ces patients ou juste du défaut de leur élimination. Les études des télomères et de la télomérase dans les lymphocytes au cours du LES iraient dans le sens de cette hypothèse, puisque les lymphocytes B et T autoréactifs sont stimulés donc prolifèrent et ainsi réactivent leur télomérase mais insuffisamment pour maintenir la longueur de leurs télomères (sénescence répllicative). Cependant, aucun travail n'a concerné les télomères ou la télomérase dans les cellules des tissus cibles du LES comme le rein, la peau, les synoviales. . . Or, des travaux réalisés dans la cirrhose biliaire primitive ont montré que les cellules de l'épithélium biliaire atteintes étaient sélectivement sénescences par rapport à des cellules saines [39] et de même, les cellules musculaires lisses primaires issues de patients atteints de myosite à inclusion sont sénescences en comparaison aux mêmes cellules issues de sujets sains [40]. Comme ces travaux réalisés dans d'autres pathologies auto-immunes semblent l'indiquer, il pourrait exister un vieillissement accéléré dans les tissus cibles des patients atteints de LES, donc une érosion accrue des télomères dans ces cellules entraînant leur apoptose précoce et massive, le tout associé (ou induisant) un défaut d'élimination des corps apoptotiques. Ce phénomène créant un cercle vicieux stimulant les clones B et T autoréactifs. Afin de mieux comprendre ce phénomène, il pourrait être utile d'étudier la longueur des télomères et l'activité de la télomérase dans les cellules cibles et non dans les cellules immunitaires au cours du lupus.

De façon intéressante, deux équipes ont récemment identifié des mutations hétérozygotes des gènes codant pour les sous-unités de la télomérase (hTERT et hTR) chez des patients atteints de formes familiales de fibrose pulmonaire idiopathique [41,42]. Ces sujets présentaient des télomères raccourcis (par rapport à des témoins appariés en fonction de leur âge) et une activité télomérasique diminuée ou nulle en fonction des types de mutations. Or, il existe certaines formes de LES avec atteinte pulmonaire proche de celles

de la fibrose pulmonaire idiopathique. Chez de tels patients avec un LES et une atteinte fibrosante pulmonaire, il pourrait y avoir une diminution de l'activité télomérasique en rapport avec ces mêmes mutations de la télomérase. Ainsi, il pourrait être intéressant de rechercher des mutations de ce gène dans ces formes de LES, surtout dans les familles agrégeant plusieurs cas de fibrose pulmonaire ou de maladie auto-immune.

Certains auteurs préconisent que la mesure de l'activité télomérasique dans les PBMC des sujets atteints de LES pourrait refléter l'activité de la maladie et qu'elle pourrait être utilisée comme indice d'activité de la maladie, voire comme marqueur de suivi de l'efficacité d'un traitement [26–28]. Pour mesurer cette activité, la technique du TRAP semi-quantitatif est la plus utilisée, mais la PCR quantitative, plus précise, plus récente et plus rapide serait à privilégier. Dans une même optique, la mesure de la longueur des télomères pourrait être étudiée en tant que facteur pronostic potentiel ; afin de savoir si les patients avec des télomères très courts présentent une forme sévère d'embée ou dans son évolution et s'ils pourraient ou non constituer une indication à débiter un traitement immunosuppresseur en première intention. La technique de référence pour mesure de la longueur des télomères reste le Southern blot, mais le Flow-FISH pourrait être validé sur de plus amples échantillons de patients lupiques, car cette dernière technique est plus simple à réaliser et permet d'étudier des populations cellulaires minoritaires.

Étant donné l'érosion télomérique accrue et une certaine augmentation de l'activité télomérasique retrouvée dans le LES, les télomères et la télomérase pourraient dans l'avenir constituer une piste de recherche nouvelle et intéressante dans cette pathologie où l'arsenal thérapeutique n'est actuellement pas optimal. Des molécules bloquant ou stimulant la télomérase sont actuellement en cours de développement afin d'être utilisées en cancérologie [20]. Dans une première hypothèse, s'il est confirmé que l'érosion télomérique accrue est en rapport avec une activité télomérasique insuffisante, une stimulation de la télomérase ou encore l'apport d'une télomérase recombinante, par thérapie génique, pourrait être envisagée, plus particulièrement dans les cas où des mutations du gène de l'enzyme seraient identifiées au cours de cette affection. Dans une seconde hypothèse, étant donné que l'activité télomérasique est plus élevée dans les lymphocytes B [32], cellules impliquées dans la pathogénie de cette maladie, l'utilisation de molécules anti-télomérase, comme les *G-quadruplex ligands* [20], pourrait être testée in vitro. De telles molécules ne devraient pas avoir d'effets néfastes à court terme sur les cellules germinales et les lymphocytes, car celles-ci ont des télomères plus longs que les cellules ciblées. La principale limite à leur utilisation est leur délai d'action qui est fonction de la taille initiale des télomères : plus ces derniers sont longs, plus ce délai serait long.

Enfin, il existe souvent un syndrome inflammatoire dans le LES, phénomène connu être responsable d'une érosion télomérique accrue [23]. Or il existe des substances anti-oxydantes ou anti-inflammatoires simples, comme la vitamine D qui, en cas de supplémentation, sont capables d'allonger la longueur des télomères, d'une part, et, d'autre part, l'hypovitaminose D est significativement associée à des maladies auto-immunes [43–47]. Ainsi, de telles substances pourraient dans le futur constituer un adjuvant chez patients lupiques, surtout chez ceux présentant des télomères courts afin de rallonger des télomères raccourcis par le stress oxydatif associé au syndrome inflammatoire.

5. Conclusion

Cette revue propose une synthèse de la littérature montrant conjointement qu'au cours du LES, il existe des anomalies du système télomère/télomérase (Fig. 3). L'implication de ce système

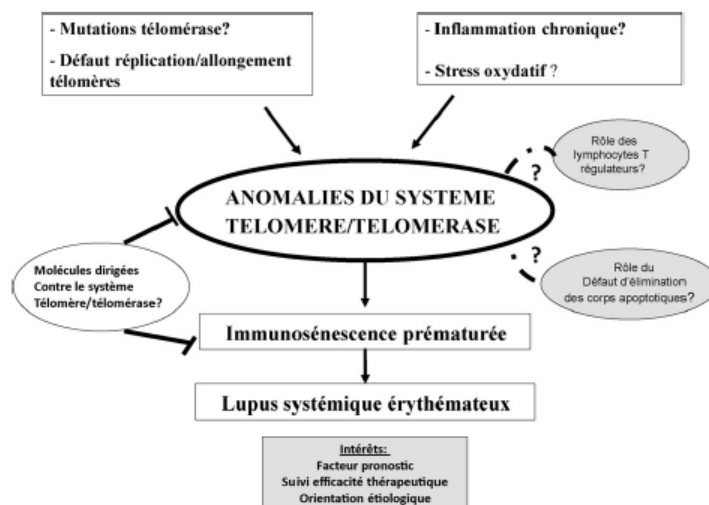


Fig. 3. Schéma représentant les principales hypothèses soulevées par l'étude du système télomère/téomérase au cours du lupus érythémateux systémique.

dans la physiopathologie du LES, notamment son rôle dans le défaut d'élimination des corps apoptotiques, nécessiterait d'être approfondie afin mieux comprendre les mécanismes moléculaires entrant ici en jeu et de confirmer les données par la mise en place d'études prospectives sur de larges effectifs avec des techniques reproductibles et comparables. Ce travail pourrait ouvrir des perspectives de recherche à visée thérapeutiques, ciblant le système télomère/téomérase, et représenter ainsi une approche nouvelle du traitement du LES et des maladies auto-immunes.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Remerciements

S. Georgin-Lavialle est lauréate d'un poste accueil CNRS – AP-HP.

Références

- [1] Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661–73.
- [2] Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2034–43.
- [3] Cech TR. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 2004;116:273–9.
- [4] Djojicubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 2003;15:164–75.
- [5] Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:318–24.
- [6] Masutomi K, Hahn WC. Telomerase expression – only half the story. *Cancer Biol Ther* 2003;2:685–6.
- [7] Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992;27:375–82.
- [8] Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614–36.
- [9] Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:98–103.
- [10] Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer – look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2002;2:879–84.
- [11] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011–5.
- [12] Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* 2001;47:519–24.
- [13] Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993;52:661–7.
- [14] Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998;16:743–7.
- [15] Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* 2000;26:114–7.
- [16] Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992;11:1921–9.
- [17] Artlett CM, Black CM, Briggs DC, Stevens CO, Welsh KI. Telomere reduction in scleroderma patients: a possible cause for chromosomal instability. *Br J Rheumatol* 1996;35:732–7.
- [18] Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 2008;8:450–8.
- [19] Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8:167–79.
- [20] Zimmermann S, Martens UM. Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:906–21.
- [21] Mathian A, Koutourov S. Interféron- α : une cytokine clé dans la physiopathologie du lupus systémique. *Rev Med Interne* 2008;29:696–700.
- [22] Gorczy J, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol* 2006;41:246–51.
- [23] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27:339–44.
- [24] Janko C, Schorn C, Grossmayer GE, Frey B, Herrmann M, Gaip US, et al. Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev* 2008;8:9–12.
- [25] Honda M, Mengesha E, Albano S, Nichols WS, Wallace DJ, Metzger A, et al. Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2001;99:211–21.
- [26] Kurosaka D, Ozawa Y, Yasuda J, Yamada A, Akiyama M, Saito S, et al. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1158–9.
- [27] Katayama Y, Kohriyama K. Telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of systemic connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2001;28:288–91.
- [28] Kurosaka D, Yasuda J, Yoshida K, Yokoyama T, Ozawa Y, Obayashi Y, et al. Telomerase activity and telomere length of peripheral blood mononuclear cells in SLE patients. *Lupus* 2003;12:591–9.
- [29] Wu CH, Hsieh SC, Li KJ, Lu MC, Yu CL. Premature telomere shortening in polymorphonuclear neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus is related to the lupus disease activity. *Lupus* 2007;16:265–72.
- [30] Beier F, Balabanov S, Amberger CC, Hartmann U, Manger K, Dietz K, et al. Telomere length analysis in monocytes and lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus using multi-color flow-FISH. *Lupus* 2007;16:955–62.
- [31] Tarhan F, Vural F, Kosova B, Aksu K, Cogulu O, Keser G, et al. Telomerase activity in connective tissue diseases: elevated in rheumatoid arthritis, but markedly decreased in systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2008;28:579–83.

- [32] Kurosaka D, Yasuda J, Yoshida K, Yoneda A, Yasuda C, Kingetsu I, et al. Abnormal telomerase activity and telomere length in T and B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006;33:1102–7.
- [33] Klapper W, Moosig F, Sotnikova A, Qian W, Schroder JO, Parwaresch R. Telomerase activity in B and T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1681–3.
- [34] Fritsch RD, Shen X, Illei GG, Yarboro CH, Prussin C, Hathcock KS, et al. Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:2184–97.
- [35] Boddaert J, Huong DL, Amoura Z, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:348–59.
- [36] Rovinsky J, Tuchynova A. Systemic lupus erythematosus in the elderly. *Autoimmun Rev* 2008;7:235–9.
- [37] Descloux E, Durieu I, Cochat P, Vital Durand D, Ninet J, Fabien N, et al. Paediatric systemic lupus erythematosus: prognostic impact of antiphospholipid antibodies. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:183–7.
- [38] Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, et al. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 1999;59:5917–21.
- [39] Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Nakada S, Nakanuma Y. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 2008;48:186–95.
- [40] Morosetti R, Broccolini A, Sancricca C, Gliubizzi C, Gidaro T, Tonali PA, et al. Increased aging in primary muscle cultures of sporadic inclusion-body myositis. *Neurobiol Aging* 2008. Sept25 (Epub ahead of print).
- [41] Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Adler JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007;356:1317–26.
- [42] Garcia CK, Wright WE, Shay JW. Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7406–16.
- [43] Hillman L, Cassidy JT, Johnson L, Lee D, Allen SH. Vitamin D metabolism and bone mineralization in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1994;124:910–6.
- [44] Mathieu C, Badierhoop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:261–6.
- [45] Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296:2832–8.
- [46] Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willett WC, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62:60–5.
- [47] Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, Paximadas D, Kimura M, Nessa A, et al. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1420–5.

Résumé:

La mastocytose est une maladie hétérogène, caractérisée par une accumulation de mastocytes dans l'organisme. Les enfants et les adultes ont des mutations différentes de *c-Kit*. Dans un premier travail, nous avons montré que seules les formes adultes sont associées à la réactivation de la télomérase, alors que les formes pédiatriques ne sont pas. Cela semble être lié aux différences de mutations de *c-Kit* observées entre adultes et enfants et pourrait expliquer pourquoi seules les formes pédiatriques de mastocytose régressent spontanément et non les formes adultes. Ces résultats aident à mieux comprendre la physiopathologie de la mastocytose. Dans un second travail, nous avons étudié le lien entre la longueur des télomères et les troubles psychologiques des adultes atteints de mastocytose. Nous avons montré que les réactions émotionnelles négatives sont corrélées au raccourcissement de la longueur des télomères des leucocytes et que l'érosion télomérique est fortement prédite par les défauts de régulation des émotions. Nous émettons l'hypothèse qu'au cours des troubles neuropsychologiques, le mastocyte pourrait être impliqué dans le raccourcissement de la longueur des télomères en périphérie.

Mots clefs: télomères, télomérase, mastocyte, mastocytose, *c-Kit*

Title: Involvement of the telomere/telomerase system in mastocytosis.

Abstract: Mastocytosis is a heterogeneous disease characterized by an accumulation of mast cells. Children and adults hold different *c-Kit* mutations. In a first work, we showed that only adult forms are associated with reactivation of telomerase whereas pediatric forms are not. This seems to be linked to the differential *c-Kit* mutations observed between adults and children and could explain why only pediatric mastocytosis spontaneously regress in comparison with adult forms. These results help to better elucidate the pathophysiology of mastocytosis. In a second work, we studied the link between the telomere length and the psychological features of adults with mastocytosis and showed that negative emotionality correlated negatively to telomere length and that telomere shortening was strongly predicted by emotion regulation deficits. We hypothesize that in psychological disorders, mast cell may represent the link between brain and periphery and induce telomere shortening.

Key words: telomere, telomerase, mast cell, mastocytosis, *c-Kit*

Laboratoire d'accueil : Unité CNRS UMR 8147 : « Cytokines, hématopoïèse et réponse immune » ; 149 rue de Sèvres, Hôpital Necker, 75015 PARIS.